

Analyse der CD4⁺ T-Zellerkennung lytisch Epstein-Barr-Virus-infizierter B-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Fakultät für Biologie

der Ludwig-Maximilians-Universität München



von

Isabella Sofia Rampp

2011

angefertigt am Helmholtz Zentrum München

Dissertation eingereicht am 23.08.2011

Gutachter: 1. PD Dr. Josef Mautner
 2. Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2011

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder versucht habe, eine Dissertation anderweitig einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen.

Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden.

München, 23.08.2011

Isabella Rampp

Inhaltsverzeichnis

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	III
INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 SUMMARY	3
3 EINLEITUNG	5
3.1 Herpesviren	5
3.2 Epstein-Barr-Virus	5
3.3 EBV-assoziierte Erkrankungen	6
3.3.1 Infektiöse Mononukleose	6
3.3.2 EBV-assoziierte Erkrankungen in immunkompetenten Individuen	7
3.3.3 EBV-assoziierte Erkrankungen in immundefizienten Patienten	8
3.4 Das Genom des EBV	8
3.5 Der Infektionsweg von EBV	9
3.6 Die latente Infektion und Wachstumstransformation von B-Zellen	10
3.7 Die lytische Vermehrung von EBV	12
3.7.1 Die sehr frühen Gene: Initiation der viralen DNA-Replikation	13
3.7.2 Die frühen Gene: Replikationsmaschinerie	13
3.7.3 Die späten Gene: Verpackung und Freisetzung der Viruspartikel	14
3.7.4 Signale der lytischen Reaktivierung von EBV <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	14
3.8 Die Immunantwort gegen EBV	16
3.8.1 Klassischer MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg	18
3.8.2 Die EBV-spezifische CD8 ⁺ T-Zellantwort	19
3.8.3 Die EBV-spezifische CD4 ⁺ T-Zellantwort	19
3.9 Modulation der Immunantwort durch EBV	20
3.9.1 Immunevasion in der Latenz	20
3.9.2 Immunevasion im lytischen Zyklus	21
3.10 Immuntherapie	24
3.11 Fragestellung	25
4 MATERIALIEN	26
4.1 Zelllinien	26
4.2 Bakterienstämme	28
4.3 Plasmide	28
4.4 DNA-modifizierende Enzyme	29
4.5 Antikörper	30
4.6 Zytokine	30
4.7 Chemikalien	31
4.8 Verbrauchsmaterialien	32

4.9	Medien, Puffer und Lösungen	33
4.9.1	Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen	33
4.9.2	Zellkulturmedien	34
4.10	Geräte	35
4.11	Software	36
5	METHODEN	37
5.1	Mikrobiologische Methoden	37
5.1.1	Kultivierungsverfahren	37
5.2	Molekularbiologische Methoden	37
5.2.1	Isolation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien	37
5.2.2	Isolation großer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien	38
5.2.3	Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen	39
5.2.4	Synthese von glatten Enden nach dem Restriktionsverdau	39
5.2.5	Phenol-Chloroform-Extraktion	40
5.2.6	Ligation	40
5.2.7	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	41
5.2.8	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	41
5.2.9	DNA-Sequenzanalyse	42
5.2.10	Herstellung elektrokompeter Bakterien	42
5.2.11	Transformation elektrokompeter Bakterien	42
5.3	Proteinbiochemische Methoden	43
5.3.1	Herstellung von RIPA-Extrakten	43
5.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
5.3.3	Coomassie-Färbung	44
5.3.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen	44
5.4	Zellbiologische Methoden	46
5.4.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	46
5.4.2	Bestimmung der Zellzahl	47
5.4.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	47
5.4.4	Isolation von peripheren mononuklearen Zellen aus Vollblut durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	48
5.4.5	Herstellung von Viruskonzentrat	48
5.4.6	Transfektion der HEK293T-Zellen mit Polyethylenimin	49
5.4.7	Transfektion von Suspensionszellen mittels Elektroporation	49
5.4.8	Magnetische Zellseparation	50
5.4.9	Durchflusszytometrie	51
5.4.10	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	51
6	ERGEBNISSE	53
6.1	Induktion des lytischen Zyklus von EBV in B-Zellen durch verschiedene chemische Stimuli	53
6.2	Kinetik der EBV-spezifischen T-Zellerkennung von LCL nach Induktion des lytischen Zyklus mittels 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat	56
6.3	Induktion des lytischen Zyklus von EBV in lymphoblastoiden Zelllinien mittels konditionaler BZLF1-Expression	58
6.3.1	Etablierung eines konditionalen BZLF1-Expressionssystems in LCL	58
6.3.2	Induktion des lytischen Zyklus durch die Expression von BZLF1	60
6.4	Untersuchung der sequentiellen Expression lytischer Proteine nach Induktion von BZLF1 in LCL	64
6.5	Analyse der MHC-Klasse-II-restringierten Erkennung von lytisch EBV-infizierten B-Zellen <i>in vitro</i>	65
6.5.1	Bestimmung des Zeitpunktes der Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln nach Induktion des lytischen Zyklus in LCL	65

6.5.2	Bestimmung der EBV-spezifischen T-Zellerkennung von LCL zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des lytischen Zyklus	66
6.6	Induktion des lytischen Zyklus in LCL Z(-) mittels BZLF1-Expression	69
6.6.1	Untersuchung der sequentiellen Expression lytischer Proteine nach Induktion der BZLF1-Expression in LCL Z(-) JM	70
6.6.2	Untersuchung der LCL Z(-), in denen sich EBV nicht reaktivieren ließ	71
6.6.3	Induktion des lytischen Zyklus in LCL Z(-) des Spenders JM	73
6.6.4	CD4 ⁺ T-Zellen erkennen lytisch EBV-infizierte B-Zellen nicht vor Freisetzung von Virusnachkommen	77
6.6.5	BZLF2 beeinflusst nicht die CD4 ⁺ T-Zellerkennung von lytisch EBV-infizierten Zellen.	81
6.7	Untersuchung des Einflusses einzelner lytischer EBV-Proteine auf die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-restringierte Antigen-präsentation	83
6.7.1	Etablierung konditionaler Antigenpräsentationssysteme	83
6.7.2	Nachweis der induzierbaren Expression der Antigene nach stabiler Transfektion der Plasmide in LCL	85
6.7.3	Nachweis der induzierbaren Expression der immunmodulatorischen Proteine BNLF2a und BGLF5 in HEK293T-Zellen	92
6.7.4	Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die Antigenpräsentation	93
7	DISKUSSION	101
7.1	Die CD4⁺ T-Zellerkennung von lytisch EBV-infizierten B-Zellen	101
7.1.1	Induktion des lytischen Zyklus von EBV in LCL und BL-Zelllinien durch verschiedene Agenzien	101
7.1.2	Etablierung eines konditionalen Zellsystems, welches die lytische Reaktivierung von EBV ermöglicht	102
7.1.3	Die Induktion des lytischen Zyklus löst die kaskadenartige Expression lytischer EBV-Genprodukte aus	103
7.1.4	Nicht jede lytisch EBV-infizierte Zelle setzt infektiöse Viren frei	104
7.1.5	Lytisch infizierte LCL werden erst nach Virusfreisetzung von EBV-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen erkannt	106
7.2	Der Einfluss lytischer EBV-Proteine auf die Antigenpräsentation	109
7.2.1	Kein Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die CD4 ⁺ T-Zellerkennung von EBNA3C	110
7.2.2	ICP47 und BILF1 interferieren mit der BZLF1-Erkennung durch CD8 ⁺ T-Zellen	111
7.2.3	BGLF5 interferiert mit der LMP2A-Erkennung durch CD8 ⁺ T-Zellen	111
7.3	Ausblick	113
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	114
	TABELLENVERZEICHNIS	116
	LITERATURVERZEICHNIS	117
	DANKSAGUNG	131
	LEBENS LAUF	132

Abkürzungsverzeichnis

α	anti/alpha
AA	<i>amino acid</i>
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
Amp	Ampicilin-Resistenz
AK	Antikörper
APC	<i>antigen presenting cell</i>
β	beta
BARF1	<i>BamHI A Rightward openreading Frame 1</i>
BARTs	Transkripte der BamHI A Region
BCR	<i>B cell receptor</i>
BL	Burkitt-Lymphom(zellen)
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bZIP	<i>basic leucine zipper</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
Ca^{2+}	Kalzium-Ion
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cHL	<i>classical Hodgkin-Lymphoma</i>
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
CLIP	<i>class II invariant chain associated peptide</i>
CMV	Cytomegalievirus
CO_2	Kohlendioxid
CTL	<i>cytotoxic T cell</i>
DAG	Diacylglycerin
DC	<i>dendritic cell</i>
DLI	Donorlymphozyteninfusion
DMEM	Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>2'-deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	2' Deoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
E	<i>early antigen</i>
EaD	<i>diffuse early antigen</i>
EBER	<i>EBV encoded RNA</i>
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Ery	Erythromycin
EtOH	Ethanol

FCS	<i>fetal calf serum</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
g	Gramm
GAr	<i>glycine-alanin repeat</i>
γ	gamma
GFP	grünfluoreszierende Protein
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GvHD	<i>graft-versus-host disease</i>
Gy	Gray
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C-Virus
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HEK	<i>human embryonic kidney cell</i>
HEPES	(2-Hydroxyethyl)-1-Piperaziny-Ethansulfonsäure
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HL	Hodgkin-Lymphom
H ₂ O	Wasser
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS	humanes Serum
HSCT	<i>hematopoietic stem cell transplantation</i>
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IE	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon
Ii	invariante Kette
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IM	infektiöse Mononukleose
IP ₃	Inositoltriphosphat
IR	<i>internal repeats</i>
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kbp	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
l	Liter
LB	Luria-Bertani
L	<i>late antigen</i>
LCL	lymphoblastoide Zelllinie
LMP	<i>latent membrane protein</i>
LP	<i>leader protein</i>
LPD	<i>lymphoproliferative disorder</i>

M	Mol(ar)
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MIIC	MHC-Klasse-II-Kompartiment
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
ml	Milliliter
min	Minute
mind.	mindestens
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol(ar)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	normal
NaCl	Natriumchlorid
NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>
nHL	non-Hodgkin-Lymphom
NK	Natürliche Killer (Zelle)
nm	Nanometer
nM	Nanomol(ar)
NPC	<i>nasopharyngeal carcinoma</i>
Ω	Ohm
OD	Optische Dichte
oriLyt	lytischer Replikationsursprung
oriP	plasmidaler Replikationsursprung
p.A.	<i>pro analysi</i>
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumjodid
PIP ₂	Phosphatidylinositbiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC- γ	Phospholipase C- γ
pEry	Erythromycin-regulierbarer Promotor
pTet-bi	bidirektionaler Tetrazyklin-regulierbarer Promotor
PTLD	<i>post-transplant lymphoproliferative disorder</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

RRE	<i>Rta-responsive element</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sek	Sekunde
SOT	<i>solid organ transplantation</i>
T	Tween-20
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween 20</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _H	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor-Nekrorefaktor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
TR	<i>terminal repeats</i>
Treg	regulatorische T-Zellen
ün	über Nacht
V	Volt
VCA	<i>viral capsid antigen</i>
v.a.	vor allem
vGPCR	viralen G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren
vIL-10	virales Interleukin 10
VPA	Valproinsäure
x g	x-fache Schwerkraft
z.B.	zum Beispiel
Zp	<i>BZLF1-Promotor</i>
ZRE	<i>BZLF1-responsive elements</i>
%	Prozent

Im Rahmen der Arbeit verwendete Begriffe aus dem Englischen wurden durch kursive Schreibweise gekennzeichnet.

1 Zusammenfassung

Mehr als 90% der Weltbevölkerung sind mit dem onkogenen Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert. Trotz der hohen Durchseuchungsrate treten EBV-assoziierte Tumoren vergleichsweise selten auf. Die EBV-Infektion wird normalerweise durch T-Zellen kontrolliert; Inzidenz und Schwere EBV-assoziiierter Erkrankungen sind in Patienten mit eingeschränkter T-Zellfunktion deutlich erhöht. Obwohl klinische Daten auf die Bedeutung von CD4⁺ T-Zellen in der Kontrolle der EBV-Infektion hinweisen, ist über ihre Funktion in der Ausbildung einer antiviralen Immunität noch wenig bekannt. In Vorarbeiten wurden Antigene der Virushülle als immundominante Zielstrukturen der EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort identifiziert. Strukturantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen verhindern über die Erkennung und Eliminierung neu-infizierter B-Zellen die weitere Ausbreitung der EBV-Infektion. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Strukturantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen darüber hinaus zu einer Reduktion der Viruslast beitragen, indem sie lytisch infizierte Zellen erkennen und eliminieren, noch bevor infektiöse Viruspartikel freigesetzt werden. Dazu wurde über die konditionale Expression von BZLF1, dem Schlüsselprotein für die Induktion des lytischen Zyklus, ein *in vitro* Zellsystem etabliert, das eine Reaktivierung von EBV in latent infizierten B-Zellen ermöglicht. Mit Hilfe von Kulturüberstand-Transferexperimenten konnte eine einsetzende Virusfreisetzung 20 bis 24 h nach Induktion der BZLF1-Expression nachgewiesen und somit die Dauer der lytischen Reaktivierung erstmals genau bestimmt werden. Innerhalb dieses Zeitfensters wurde eine sehr frühe und fortdauernde Erkennung lytisch infizierter Zellen durch EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen beobachtet, was aufgrund der beschriebenen Interferenz mehrerer viraler, lytischer Genprodukte mit der Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse-I unerwartet war. Diese Ergebnisse implizieren, dass die bislang singular und zum Teil in heterologen Zellsystemen untersuchten, immunmodulatorischen Eigenschaften dieser viralen Proteine im physiologischen Kontext des lytischen Zyklus eine deutlich geringere Wirkung zeigen als bislang angenommen, und dass lytisch infizierte Zellen durchaus von CD8⁺ T-Zellen erkannt und eliminiert werden können.

Dagegen erkannten Strukturantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen lytisch infizierte Zellen erst nach Virusfreisetzung. Somit tragen diese Zellen vermutlich nicht zur Verringerung der Viruslast bei. Eine Hemmung der MHC-Klasse-II-restringierten Immunerkennung durch das als immunmodulatorisch beschriebene virale Protein BZLF2 konnte durch die Verwendung einer BZLF2-defizienten EBV-Mutante ausgeschlossen werden.

Um die immuninhibitorischen Eigenschaften weiterer lytischer Proteine von EBV zu untersuchen, wurde ein konditionales Vektorsystem entwickelt, das eine zeitlich verzögerte Expression von Modellantigenen und potentiell immunmodulatorischen Genprodukten ermöglicht. Mit Hilfe dieses Expressionssystems soll nun nach viralen Kandidaten gesucht werden, die für die fehlende Erkennung lytisch infizierter Zellen durch CD4⁺ T-Zellen verantwortlich sind.

2 Summary

More than 90% of the human population carries the oncogenic Epstein-Barr virus (EBV) as a lifelong persistent infection. Despite this high rate of infection, EBV-associated tumors are relatively rare. EBV infection is normally controlled by T cells, as indicated by an increased incidence and severity of EBV-associated disorders in patients with T cell dysfunctions. While clinical data have highlighted the importance of CD4⁺ T cells in the control of EBV infection, how these cells aid in establishing anti-viral immunity remained largely unknown.

Earlier studies demonstrated that antigens of the viral envelope are the immunodominant targets of the EBV-specific CD4⁺ T-cell response. By recognizing and eliminating newly EBV-infected B-cells, virion antigen-specific CD4⁺ T cells inhibit spreading of the infection.

The aim of this study was to investigate whether CD4⁺ T cells are also able to recognize and eliminate lytically infected cells before infectious viral particles are released and thereby contribute to a reduction in viral load. To this aim, an *in vitro* cell system was established that allows reactivation of EBV in latently infected B cells by the conditional expression of BZLF1, the key protein for the switch from latent to lytic phase. Cell supernatant transfer experiments demonstrated that virus was released beginning 20-24 h after induction of BZLF1 expression, and thereby precisely defined the duration of the lytic cycle. Within this time frame, a very early and continuous recognition of infected cells by lytic EBV-specific CD8⁺ T cells was observed. This was unexpected because several viral lytic gene products have been described to interfere with the presentation of antigens on MHC class I.

By contrast, CD4⁺ T cells specific for structural antigens recognized lytically infected cells only after virus release. Using a BZLF2 knockout EBV mutant, inhibition of MHC class II-restricted immune recognition by this immunomodulatory viral protein was excluded as mechanism of immune evasion. These results suggest that the formerly established immunomodulatory properties of singular, and often ectopically expressed viral proteins have a significantly smaller effect in the physiological context of the lytic cycle than previously thought, and that lytically infected cells can be recognized and eliminated by virus-specific CD8⁺, but not CD4⁺ T cells.

To further investigate immune-inhibitory properties of lytic cycle proteins, a conditional vector system was developed that allows the sequential expression of potentially immunomodulatory gene products and model antigens and thereby facilitates future test-

ing viral candidates responsible for immune evasion of lytically infected cells from CD4⁺ T cell recognition.

3 Einleitung

3.1 Herpesviren

Herpesviren gehören zu den am weitesten verbreiteten, viralen Infektionserregern. Die Familie der Herpesviridae wird in die drei Unterfamilien der α -, β - und γ -Herpesvirinae eingeteilt, die sich in ihrer Pathogenese, ihrem Zelltropismus und ihren Vermehrungseigenschaften unterscheiden. Bisher sind acht humane Herpesviren beschrieben, die taxonomisch als **Humane Herpesviren (HHV) 1 bis 8** bezeichnet werden. Dazu zählen: Herpes-simplex-Virus 1 und 2 (HHV1 und HHV2), Varizella-Zoster-Virus (HHV3), Epstein-Barr-Virus (HHV4), Cytomegalievirus (HHV 5), humane Herpesviren 6 und 7 (HHV6 und HHV7), sowie das Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (HHV8) (Doerr und Gerlich, 2009).

Herpesviren zählen bezüglich ihres Genoms und ihrer Morphologie mit zu den größten und komplexesten Viren. Das Herpesvirion weist eine komplexe Struktur auf und besteht aus vier getrennten morphologischen Einheiten. Das Genom befindet sich im Viruskern und besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA. Das Nukleokapsid, das die DNA umgibt, weist eine ikosaedrische Symmetrie auf. Es besteht aus 162 Kapsomeren, von denen sich jedes aus mehreren unterschiedlichen Proteinen zusammensetzt. Außerhalb des Nukleokapsids befindet sich eine amorphe Schicht, die als Tegument bezeichnet wird. Eine Hüllmembran, deren äußere Oberfläche mit viralen Glykoproteinen besetzt ist, umgibt dieses Tegument.

Ein charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach der Primärinfektion im infizierten Wirt einen lebenslangen Zustand der Latenz zu etablieren. Die Latenz wird durch wiederkehrende Phasen der lytischen Replikation unterbrochen, durch die es zur Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln kommt.

3.2 Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört zur Unterfamilie der γ_1 -Herpesviren, Gattung Lymphokryptoviren. Das EBV ist ein äußerst erfolgreiches, humanpathogenes Virus: Über 90% der Weltbevölkerung sind mit EBV infiziert (Cohen, 2000). Entdeckt wurde das Virus 1964 von seinen Namensgebern Anthony Epstein und Yvonne Barr, die zum ersten Mal Virus-Partikel in Zellen eines Burkitt-Lymphoms (BL) elektronenmikroskopisch nachweisen konnten (Epstein et al., 1964). Vier Jahre später wurde EBV als das ätiologische Agens der heterophil-positiven, infektiösen Mononukleose (IM) nachge-

wiesen (Henle et al., 1968). Eine Verbindung zwischen EBV und der Entstehung des Burkitt-Lymphoms (BL) sowie des Nasopharynxkarzinoms (*nasopharyngeal carcinoma*, NPC) konnten erstmals durch den Nachweis viraler DNA in Tumorbiopsien durch zur Hausen et al. (1970) hergestellt werden. In den 80-er Jahren wurde EBV noch in Geweben von weiteren Tumoren, einschließlich T-Zell-Lymphomen und Hodgkin-Lymphomen (HL), entdeckt (Jones et al., 1988, Weiss et al., 1989). Im Jahre 1997 wurde EBV von der Weltgesundheitsorganisation als erstes onkogenes Virus klassifiziert (IARC, 1997).

Von EBV gibt es zwei unterschiedliche Subtypen: Typ 1 und Typ 2, auch bekannt als Typ A und Typ B. Diese EBV-Stämme weisen Unterschiede in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz der nukleären Antigene (*EBV nuclear antigens*, EBNA) auf (Dambaugh and Kieff, 1982, Sample et al., 1990). EBV Typ 1 besitzt *in vitro* eine wesentlich höhere Transformationseffizienz als EBV Typ 2 (Rickinson et al., 1987). Zudem zeigen die beiden EBV-Subtypen ein unterschiedliches epidemiologisches Verbreitungsmuster. EBV Typ 1 ist in Industrieländern vorherrschend, während in Äquatorialafrika und Neuguinea die Prävalenz von Typ 2 und Typ 1 annähernd gleich ist (Zimmer et al., 1986, Rowe and Clarke, 1989, Young et al., 1987).

3.3 EBV-assoziierte Erkrankungen

3.3.1 Infektiöse Mononukleose

Die **IM** ist eine im Rahmen der EBV-Primärinfektion auftretende, selbstlimitierende, lymphoproliferative Erkrankung, die sich klinisch durch Symptome wie Fieber, Tonsillitis, Lymphknotenschwellung und oftmals auch Milz- und Lebervergrößerung äußert (Evans, 1972). Die Inzidenz der IM ist altersabhängig. Eine Primärinfektion mit EBV im Säuglings- oder Kleinkindalter verläuft in der Regel asymptomatisch. Erfolgt der erste Kontakt mit EBV jedoch erst im Jugend- oder Erwachsenenalter, so führt dies in 30-50% der Fälle zu einer akuten IM (Henle et al., 1968). Die IM ist assoziiert mit einer Lymphozytose, die durch eine massive Expansion von atypischen Lymphoblasten, hauptsächlich CD8⁺ T-Zellursprungs, charakterisiert ist (Young and Rickinson, 2004).

3.3.2 EBV-assoziierte Erkrankungen in immunkompetenten Individuen

BL, HL und NPC sind die drei häufigsten EBV-assoziierten Tumorerkrankungen in immunkompetenten Individuen (Kutok and Wang, 2006).

Klinisch werden drei Formen von **BL** unterschieden: die endemische, die sporadische und die Immundefizienz-assoziierte Form. Die zu fast 100% mit EBV-assoziierte endemische Form wurde von dem britischen Tropenarzt Denis P. Burkitt entdeckt und tritt häufig in Äquatorialafrika, Lateinamerika und Neuguinea auf (Ahn et al., 1996, Burkitt, 1958, Burkitt et al., 1965). Die sporadische Form des BL kommt überwiegend in den westlichen Ländern vor und ist nur zu etwa 15-30% mit EBV assoziiert (Hummel et al., 1995). Die dritte Form des BLs tritt in immundefizienten Patienten auf, hauptsächlich Patienten mit erworbenem Immunschwächesyndrom (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS). Trotz der relativ hohen Inzidenz eines BL bei AIDS-Patienten sind nur 30-40% dieser Tumoren EBV-positiv (Carbone, 2003). Charakteristisch für alle drei Formen des BL ist eine Chromosomentranslokation, wodurch das Proto-Onkogen *c-myc* auf Chromosom 8 unter den regulatorischen Einfluss eines der drei Immunglobulin-Loci auf den Chromosomen 2, 14 oder 22 gelangt (Croce et al., 1983, Nishikura et al., 1983). Der Zusammenhang zwischen *c-myc*-Translokation und EBV-Infektion bei der Entstehung des BL ist noch nicht vollständig geklärt.

Das **klassische HL** (*classical Hodgkin Lymphoma*, **cHL**) wird nach histologischen Kriterien in vier Subtypen unterteilt: lymphozytenreich, nodulär-sklerosierend, gemischt-zellig oder lymphozytenarm (Harris et al., 1994). In den westlichen Ländern zählt das cHL zu den häufigsten Lymphomerkkrankungen. Charakteristisch für das cHL ist das Auftreten von einkernigen Hodgkin- und mehrkernigen Reed-Sternberg-Zellen. Mehr als 40% aller cHL sind EBV-positiv und gehören meist dem gemischtzelligen Subtyp an (Glaser et al., 1997). Der Beitrag von EBV an der Tumorentstehung ist bislang unklar.

Das **NPC** wird in zwei Hauptgruppen eingeteilt, das keratinisierende und das nicht-keratinisierende Karzinom. Es handelt sich dabei um einen Tumor des Nasenrachenepithels. NPCs sind zu 100% mit EBV-assoziiert und weltweit verbreitet (Klein et al., 1974, Niedobitek et al., 1991). In Südostasien, Nordafrika und unter der Bevölkerung der Inuit tritt es endemisch (Kutok and Wang, 2006), in Europa und Nordamerika nur sporadisch auf (Cohen, 2000). Umweltfaktoren und genetische Faktoren scheinen zur Tumorentstehung beizutragen, die Rolle von EBV ist noch nicht geklärt. Hohe Antikör-

pertiter gegen EBV nach einer Therapie bei NPC sind allerdings mit einer schlechten Prognose assoziiert, wohingegen sinkende oder konstante Antikörpertiter mit einer besseren Prognose einhergehen (Halprin et al., 1986), was für eine Beteiligung von EBV am Krankheitsverlauf spricht.

3.3.3 EBV-assoziierte Erkrankungen in immundefizienten Patienten

In immungeschwächten Individuen, wie z.B. Patienten mit AIDS, kann es durch das Fehlen einer antiviralen Immunantwort zur pathologischen Proliferation EBV-infizierter Zellen kommen (**lymphoproliferative disorder, LPD**). Auch bei immunsupprimierten Patienten, z.B. Patienten nach Transplantation von Organen oder hämatopoetischen Stammzellen, steigt die Anfälligkeit für lymphoproliferative Erkrankungen. Hier spricht man von **post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD)**. Die Mehrheit der PTLDs sind B-Zell-Lymphome und in bis zu 90% mit EBV assoziiert (Paya et al., 1999).

3.4 Das Genom des EBV

Das Genom des EBV besitzt eine Größe von 172-186 kbp und liegt im Nukleokapsid als lineare, doppelsträngige DNA vor. Das virale Genom kodiert für etwa 80-100 verschiedene Proteine (Baer et al., 1984). Die Sequenz des Genoms ist in einen kurzen und einen langen singulären Abschnitt (*unique regions*, U_S und U_L) unterteilt, die fast den gesamten kodierenden Bereich umfassen (Abbildung 3.1).

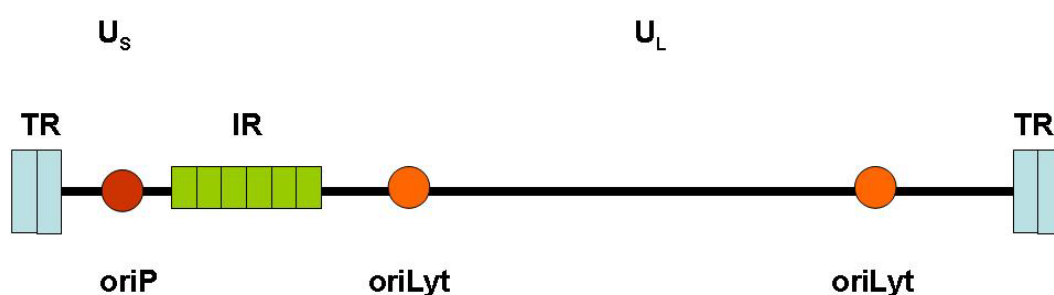


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des linearen EBV-Genoms. Abkürzungen: U_S , kurzer singulärer Abschnitt; U_L , langer singulärer Abschnitt; TR, Tandemrepetitionen; IR, interne Repetitionen; oriP, plasmidaler Replikationsursprung; oriLyt, lytischer Replikationsursprung (nach Modrow und Falke, 2002).

Zwischen diesen zwei Abschnitten befinden sich vier interne Wiederholungssequenzen (*internal repeats*, IR 1-4), die aus 6 bis 12 Wiederholungen einer Sequenz von je 3 kbp

bestehen (Cheung and Kieff, 1982). An beiden Enden des Genoms befinden sich je 0,5 kbp lange Wiederholungssequenzen (*terminal repeats*, TR) (Given et al., 1979). Nach der Infektion zirkularisiert die lineare DNA durch homologe Rekombination dieser TR-Sequenzen und liegt im Zellkern als episomale DNA vor. In der latenten Phase erfolgt die Replikation der viralen DNA vom Replikationsursprung oriP (*origin of plasmid replication*, oriP) aus durch die zelluläre DNA-Polymerase (Rawlins et al., 1985, Yates et al., 1984). In der lytischen Phase des Lebenszyklus wird das EBV-Genom ausgehend von zwei Replikationsursprüngen, oriLyt (*origin of lytic replication*), repliziert. In dieser Phase liegt das virale Genom in linearer Form vor und wird durch mehrere Replikationsrunden nach dem Prinzip der *rolling circle* DNA-Replikation amplifiziert. Für diese Replikation im lytischen Zyklus wird die virale DNA-Polymerase benötigt (Hammerschmidt and Sugden, 1988).

Das Genom von EBV war das erste vollständig klonierte und sequenzierte Herpesvirusgenom (Skare and Strominger, 1980, Baer et al., 1984). Für die Sequenzierung wurde das virale Genom durch Spaltung mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI in verschieden große Fragmente aufgeteilt. Die Nomenklatur der viralen Gene basiert auf diesen *Bam*HI-Fragmenten und setzt sich aus deren Lage und Orientierung auf dem Genom zusammen. Zum Beispiel steht BARF1 für den ersten offenen Leserahmen in rechter Orientierung im *Bam*HI-Fragment A (*Bam*HI A *Rightward openreading Frame* 1) (Kieff and Rickinson, 2006).

3.5 Der Infektionsweg von EBV

EBV infiziert überwiegend B-Zellen, aber auch andere Zellen, wie z.B. Epithelzellen (Sixbey et al., 1984), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Kanegane et al., 1996) und T-Zellen (Watry et al., 1991) können von EBV infiziert werden.

Die Übertragung von EBV erfolgt meist oral über den Speichel (Gerber et al., 1972). In seltenen Fällen kommt es durch Bluttransfusionen oder Organtransplantationen zu einer Übertragung von EBV (Qu and Rowe, 1992, Masucci and Ernberg, 1994).

Die Viruspartikel gelangen über den Speichel in das lymphatische Gewebe des Hals-Nasen-Rachenraums (Nasopharynx). Bislang ist noch nicht geklärt, ob das Virus zuerst Epithelzellen der Mundhöhle infiziert und danach B-Lymphozyten, oder ob das Virus direkt infiltrierende B-Lymphozyten infiziert.

Der Mechanismus der Infektion von B-Zellen wurde dagegen bereits weitgehend aufgeklärt. Die Adsorption der Viren an die B-Zellen wird dabei durch die zwei glykosylierten Membranproteine gp350/gp220 und gp42 vermittelt. gp350/gp220 bindet an den

Komplementrezeptor CD21 auf der Oberfläche von B-Zellen (Fingeroth et al., 1984). Anschließend bindet gp42 an humane Leukozyten Antigene (HLA) der Klasse II, was die Rezeptor-vermittelte Endozytose und die Fusion von Virushülle und Plasmamembran der B-Zellen initiiert, an der auch die Glykoproteine gB, gH und gL beteiligt sind. Nach Eintritt in die Zelle löst sich die Kapsidhülle auf. Das dabei freigesetzte lineare Genom zirkularisiert und wird mit dem zellulären Chromatin im Zellkern verpackt (Lindahl et al., 1976). EBV-Mutanten, die kein BLLF1 exprimieren, können B-Zellen noch mit niedriger Effizienz infizieren (Janz et al., 2000). Dagegen können gp42-defiziente EBV-Mutanten B-Zellen nicht mehr infizieren (Wang and Hutt-Fletcher, 1998).

Wie EBV Eintritt in CD21-negative Zellen, z.B. Epithelzellen des Rachenraums, erlangt, ist bislang unbekannt. Vermutet wird, dass $\alpha 5\beta 1$ -Integrine bei der EBV-Infektion von Epithelzellen eine Rolle spielen (Tugizov et al., 2003). Shannon-Lowe et al. (2006) konnten zeigen, dass Epithelzellen *in vitro* kaum durch freie Viren, aber sehr effizient durch Viren infiziert werden, die an CD21 auf der Oberfläche von B-Zellen gebunden waren.

3.6 Die latente Infektion und Wachstumstransformation von B-Zellen

Während der latenten Phase des Lebenszyklus von EBV werden keine infektiösen Viren produziert und es wird nur eine sehr geringe Anzahl an EBV Genen, die sogenannten Latenzgene, exprimiert. Bislang wurden vier unterschiedliche Latenzgen-Expressionsmuster beschrieben, die in vier Latenzformen zusammengefasst werden (Tabelle 3.1). In **Latenz Typ III** werden alle neun Latenzgene exprimiert. Diese kodieren für sechs nukleäre EBV-Proteine (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C und EBNA-LP) und für drei latente Membranproteine (LMP-1, LMP-2A und LMP-2B). Darüber hinaus werden zwei kleine, nicht-kodierende RNAs (EBER-1 und EBER-2) und Transkripte der *Bam*HI A Region (BARTs) exprimiert. Diese Latenzform ist charakteristisch für EBV-positive PTLD, wird in Patienten mit akuter IM beobachtet und ist charakteristisch für lymphoblastoide Zelllinien (*lymphoblastoid cell lines*, LCLs), die durch Infektion von B-Zellen mit EBV *in vitro* entstehen. In **Latenz Typ II** werden die viralen Proteine EBNA-1, LMP-1 und LMP-2 sowie die EBERs exprimiert (Kuppers, 2003). Dieses eingeschränkte Genexpressionsmuster wird in HL und in verschiedenen EBV-assoziierten, epithelialen Tumoren, wie z.B. NPC, beobachtet. In **Latenz Typ I** wird neben den EBERs als einziges EBV-Protein EBNA-1 exprimiert. Diese Latenzform ist ein charakteristisches Merkmal für EBV-positive BL-Zellen. In **Latenz Typ 0** werden

ausschließlich EBERs exprimiert. In einigen wenigen Zellen kann zudem das latente Membranprotein LMP-2A nachgewiesen werden (Miyashita et al., 1997). Diese Form der Latenz wird in nicht proliferierenden Gedächtnis-B-Zellen beobachtet.

Tabelle 3.1: Expressionsmuster viraler Gene in latent infizierten B-Zellen (nach Küppers, 2003).

Latenz	EBERs	EBNA1	EBNA2	EBNA3s	EBNA-LP	LMP1	LMP2s	Erkrankung
0	+	-	-	-	-	-	(+)	ruhende Gedächtnis B-Zelle
I	+	+	-	-	-	-	-	BL
II	+	+	-	-	-	+	+	HL
III	+	+	+	+	+	+	+	PTLDs, LCLs

Die Rolle der Latenzgene in der B-Zell-Transformation wurde mittels rekombinanter EBV-Mutanten *in vitro* untersucht. Durch diese Studien konnte nachgewiesen werden, dass EBNA-2 und LMP-1 Schlüsselfunktionen in dem Prozess der Immortalisierung besitzen und EBNA-1, EBNA-3A, EBNA-3C und EBNA-LP von Bedeutung sind (Young and Rickinson, 2004).

EBNA-2 interagiert mit dem zellulären Transkriptionsfaktor RBP-Jk (auch CBF-1 genannt) und reguliert dadurch die Transkription von viralen und zellulären Genen wie z.B. *CD21*, *cFGR*, *cMYC* und *CD23* (Wang et al., 1987, Cordier et al., 1990).

EBNA-LP ist mit EBNA-2 eines der ersten viralen Genprodukte, die nach der Infektion von B-Zellen exprimiert werden. Indem EBNA-LP mit EBNA-2 kooperiert, erhöht EBNA-LP das Transaktivierungspotenzial von EBNA-2 und verbessert dadurch die Transformation von B-Zellen (Mannick et al., 1991, Sinclair et al., 1994).

Die **LMPs** sind Transmembranproteine, die B-Zellen aktivieren und deren Überleben fördern. Während LMP-1 das zweite EBV-Protein mit einer Schlüsselfunktion im Transformationsprozess ist (Kaye et al., 1993), sind LMP-2A und LMP-2B nicht essentiell für die EBV-induzierte Transformation von B-Zellen (Longnecker, 2000). **LMP-1** ist ein klassisches Onkogen. Es induziert Lymphome in transgenen Mäusen (Kulwichit et al., 1998) und ist in der Lage, Fibroblasten von Nagetieren *in vitro* zu transformieren (Wang et al., 1985). LMP-1 ist ein funktionelles Homolog des CD40-Rezeptors, einem Aktivierungs- und Differenzierungsrezeptor auf B-Zellen (Kilger et al., 1998, Uchida et al., 1999). **LMP-2A** ahmt den B-Zellrezeptor (*B cell receptor*, BCR) nach. Dadurch ersetzt es das Überlebenssignal, das normalerweise von einem intakten BCR gesendet wird, mit dem Unterschied, dass es ein konstitutives Signal sendet (Longnecker, 2000).

LMP-2B dagegen bindet an LMP-2A und scheint dessen Aktivität zu reduzieren (Bornkamm and Hammerschmidt, 2001)

Die **EBNA3**-Proteine sind an der transkriptionellen Regulation und der Proliferation von infizierten B-Zellen beteiligt. Tomkinson et al. (1993) konnten zeigen, dass innerhalb der EBNA3-Proteinfamilie, **EBNA-3A** und **EBNA-3C** eine wichtige Rolle bei der Transformation von B-Zellen besitzen, das Protein **EBNA-3B** dagegen nicht (Tomkinson and Kieff, 1992).

EBNA-1 ist ein DNA-bindendes Protein, das an oriP bindet und für die virale DNA-Replikation des episomalen Genoms von EBV verantwortlich ist (Yates et al., 1985, Yates et al., 1984). Außerdem ist EBNA-1 essentiell für die Erhaltung des viralen Episoms in infizierten Zellen, wenn diese sich teilen (Lee et al., 1999). Während der Interphase der Zelle wird die virale DNA durch die Bindung von EBNA1 an oriP an das zelluläre Chromatin angeheftet. Bei der Mitose führt dies zur gleichmäßigen Verteilung der viralen DNA auf beide Tochterzellen.

Obwohl die **EBERs** in allen Latenzformen exprimiert werden, sind sie nicht essentiell für die Transformation von primären B-Zellen durch EBV. Die Funktion der **BART-RNAs** in EBV-infizierten Zellen ist noch nicht bekannt (Young and Murray, 2003).

3.7 Die lytische Vermehrung von EBV

In der lytischen Phase des Lebenszyklus von EBV werden infektiöse Viruspartikel produziert. Dabei werden mehr als 80 virale Proteine exprimiert, einschließlich Transkriptionsaktivatoren, DNA-Replikationsfaktoren, Strukturproteinen wie z.B. virale Kapsidantigene und Proteine, die die Immunantwort des Wirts beeinträchtigen (Kieff and Rickinson, 2006).

In diesem produktiven Lebenszyklus wird das Genom von EBV durch die virale Replikationsmaschinerie um das 100- bis 1000-fache vervielfacht (Tsurumi et al., 2005). Die Replikation von EBV findet an speziellen Stellen im Zellkern statt, den sogenannten Replikationskompartimenten. *In vivo* erfolgt die Aktivierung des lytischen Programms vermutlich in latent infizierten B-Zellen, die durch das lymphatische Gewebe des Nasopharynx zirkulieren, wobei die auslösenden Signale noch unbekannt sind (Faulkner et al., 2000). Nach der Reaktivierung von EBV kommt es zu einer kaskadenartigen Aktivierung lytischer Gene, die nach der Reihenfolge des Auftretens ihrer Genprodukte als sehr frühe (*immediate early*, IE), frühe (*early*, E) und späte (*late*, L) Gene bezeichnet werden.

3.7.1 Die sehr frühen Gene: Initiation der viralen DNA-Replikation

In der ersten Phase werden die zwei sehr frühen lytischen Gene *BZLF1* und *BRLF1* exprimiert. Diese Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die virale und manche zellulären Promotoren aktivieren. Dabei leitet BZLF1 den Übergang von der latenten zur lytischen EBV-Infektion ein und ist allein ausreichend für die Induktion der lytischen Kaskade (Hammerschmidt and Sugden, 1988).

Das Gen ***BZLF1*** kodiert für das Protein BZLF1, auch ZEBRA, Zta, Z oder EB1 genannt (Takada et al. 1986). BZLF1 gehört zu der Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren (*basic leucine zipper*, bZIP) und besteht aus drei Domänen: einer Transaktivierungsdomäne, einer DNA-Bindedomäne und einer Dimerisierungsdomäne (Flemington et al., 1992, Kouzarides et al., 1991, Packham et al., 1990). Das Protein aktiviert seine Zielgene über die Bindung an spezifische Sequenzen auf der DNA, den sogenannten BZLF1-responsiven Elementen (*BZLF1-responsive elements*, ZRE). Diese ZREs befinden sich in einer Vielzahl von Promotoren der frühen Gene sowie im *BZLF1*-Promotor (Zp) selber. Dadurch kann BZLF1 aktivierend auf seinen eigenen Promotor wirken und seine eigene Expression verstärken (Speck et al., 1997). Die Sequenz der ZRE ist identisch zu AP-1 Bindestellen, wodurch vermutlich BZLF1 auch die Transkription der Wirtszelle durch Bindung an die AP-1-Elemente beeinflussen kann (Farrell et al., 1989, Lieberman et al., 1990). Neben seiner Rolle als Transkriptionsaktivator, bindet BZLF1 an den oriLyt und ist essentiell für die oriLyt-spezifische DNA-Replikation (Schepers et al., 1996).

Die Expression des zweiten sehr frühen Gens ***BRLF1*** wird ebenfalls durch BZLF1 aktiviert. *BRLF1* kodiert für das Protein BRLF1, auch bekannt als Rta, welches ebenfalls als Transkriptionsaktivator die Expression der frühen Gene reguliert. Dabei bindet BRLF1 an bestimmte Sequenzen in den Promotoren der Zielgene, die sogenannten RREs (*Rta-responsive elements*).

3.7.2 Die frühen Gene: Replikationsmaschinerie

In der nächsten Phase werden die frühen Gene, von denen die meisten direkt an der Replikation des Genoms beteiligt sind, transkribiert. Fixman et al. (1995) konnten zeigen, dass neben *BZLF1* sechs frühe lytische Gene (*BALF5*, *BMRF1*, *BALF2*, *BBLF4*, *BSLF1* und *BBLF2/3*) für die oriLyt-spezifische DNA-Replikation von EBV essentiell sind. *BALF5* kodiert für die katalytische Untereinheit der viralen DNA-Polymerase (Tsurumi et al., 1993), während *BMRF1* für einen Replikationsfaktor der DNA-Polymerase kodiert. Ein weiterer Replikationsfaktor, ein DNA-Einzelstrang-bindendes

Protein, wird von *BALF2* kodiert. Die drei Proteine, die von *BBLF4*, *BSLF1* und *BBLF2/3* kodiert werden, bilden einen Proteinkomplex und agieren als Helikase-Primase (Fujii et al., 2000, Yokoyama et al., 1999). Diese Proteine sind direkt an der Replikation des viralen Genoms beteiligt und dadurch potente Transaktivatoren von weiteren lytischen Genen.

3.7.3 Die späten Gene: Verpackung und Freisetzung der Viruspartikel

In der letzten Phase des lytischen Zyklus werden die späten Proteine exprimiert, die für die Verpackung und die Reifung des Virus wichtig sind. Das lineare Genom wird an den terminalen Repetitionen geschnitten und in das virale Kapsid verpackt. Danach kommt es zur Freisetzung von Virionen, was die Lyse der Wirtszelle bedingt. Zu den Proteinen, die von den späten Genen kodiert werden, gehören die Proteine des Viruskapsids, des Teguments und der Virushülle. Das Kapsid von EBV besteht aus drei verschiedenen großen Kapsidproteinen, aus Kapsid-Bindeproteinen und einem Portalprotein (Kieff and Rickinson, 2006). EBV-Proteine des Teguments werden von *BPLF1*, *BOLF1*, *BBLF1*, *BGLF2*, *BVRF1*, *BGLF1*, *BSRF1* und *BGLF4* kodiert. Zu den Hüllproteinen gehören v.a. die Glykoproteine gp350/gp220, gB, gp42, gp78, gM, gN, gp150 und gL, die von den späten Genen *BLLF1*, *BALF4*, *BZLF2*, *BILF2*, *BBRF3*, *BLRF1*, *BDLF3* bzw. *BKRF2* kodiert werden (Johannsen et al., 2004).

3.7.4 Signale der lytischen Reaktivierung von EBV *in vivo* und *in vitro*

In manchen latent infizierten B-Zelllinien kommt es *in vitro* zur spontanen Aktivierung der Virusreplikation. Die Frequenz der Reaktivierung ist für jede B-Zelllinie charakteristisch und liegt zwischen Null und nur wenigen Prozent. Bislang ist ungeklärt, warum innerhalb einer Zelllinie immer nur eine Subpopulation lytisch reaktivierbar ist, und nie die gesamte Population. Unter verschiedenen lymphoblastoiden Zelllinien sind latent EBV-infizierte B-Zellen der Krallenaffen (*marmoset monkey*) leichter induzierbar als humane Lymphoblasten eines Erwachsenen. Neonatale, humane Lymphoblasten sind wiederum kaum induzierbar (Miller and Lipman, 1973).

Der physiologische Reiz für die *in vivo* Reaktivierung von EBV ist noch nicht bekannt. Vermutet wird, dass die Differenzierung von der ruhenden Gedächtnis B-Zelle zu einer Plasmazelle nach Antigenerkennung die lytische Aktivierung von EBV auslösen kann (Laichalk and Thorley-Lawson, 2005). Das Signal der Reaktivierung geht dabei vermutlich vom BCR aus. Wird ein BCR durch die Bindung eines Antigens stimuliert, kommt

es zur Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ). Die PLC- γ spaltet Phosphatidylinositolbiphosphat (PIP₂) in Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). Durch aktives IP₃ steigt die Konzentration an Kalzium-Ionen (Ca²⁺) in der Zelle stark an und DAG aktiviert gemeinsam mit Ca²⁺-Ionen die Proteinkinase C (PKC). Die PKC wiederum spielt eine essentielle Rolle in der Induktion der lytischen Kaskade von EBV.

In wenigen Zelllinien, wie z.B. der Akata BL-Zelllinie, können zwischen 20-50% der Zellen durch die Quervernetzung des BCR auf der Zelloberfläche zum Wechsel von der latenten in die lytische Phase stimuliert werden (Takada and Ono, 1989). Die Quervernetzung der BCRs durch Immunglobulin-(Ig)-Antikörper induziert die gleichen Signale in der Zelle, als würde ein spezifisches Antigen an den BCR binden. Der Grund dafür, dass Akata-Zellen besonders permissiv für die EBV-Reaktivierung sind, ist vermutlich auf deren Latenz Typ I zurückzuführen. Die Abwesenheit von LMP2A in diesem Latenzstadium erleichtert die Induktion des lytischen Zyklus (Miller et al., 1994). LCL, die das komplette Repertoire an latenten Genen exprimieren (Latenz Typ III), sind dagegen nicht oder kaum permissiv für die lytische Infektion (Longnecker and Miller, 1996).

In vitro sind einige exogene Stimuli bekannt, die zur Reaktivierung von EBV in manchen infizierten Zellen führen können. Zu diesen chemischen Induktoren, die bereits gut charakterisiert sind, gehören Phorbolster, welche Agonisten der PKC sind (zur Hausen et al., 1978) und Kalzium-Ionophoren, die die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöhen (Faggioni et al., 1986). Butyrat und Trichostatin A sind Inhibitoren von Histon-Deacetylasen (*histone deacetylase inhibitor*, HDACi) und können eine Stimulation des lytischen Zyklus bewirken (Luka et al., 1979, Yoshida et al., 1990). Dabei führt vermutlich die verstärkte Acetylierung der Histone zur Aktivierung der Genexpression und somit zur Reaktivierung von EBV (Jenkins et al., 2000). Durch den Inhibitor einer zellulären DNA-Methyltransferase (5-Aza-2-Deoxycytidine) kann die lytische EBV-Replikation ebenfalls induziert werden (Ben-Sasson and Klein, 1981). Di Renzo et al. (1994) zeigten, dass in BL-Zelllinien durch Zugabe eines anti-*Transforming Growth Factor*-(TGF- β)-Antikörpers die Induktion des lytischen Zyklus vermindert werden kann. Dies deutet darauf hin, dass autokrines TGF- β zur EBV-Reaktivierung führen kann.

All die genannten chemischen Induktoren wirken auf unterschiedliche Ziele in den Zellen und verschiedene EBV-infizierte Zelllinien reagieren unterschiedlich auf die jeweiligen Stimuli. Der Phorbolster 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) weist dabei das größte und das effizienteste Wirkungsspektrum auf (Speck et al., 1997).

3.8 Die Immunantwort gegen EBV

Die Infektion von Menschen mit EBV führt zu einer humoralen sowie einer zellulären Immunantwort gegen das Virus. In gesunden, immunkompetenten Individuen ist eine EBV-Infektion nicht lebensbedrohlich und wird im Allgemeinen durch das Immunsystem kontrolliert. EBV-spezifische Antikörper sind zwar von diagnostischer Bedeutung, spielen aber bei der Bekämpfung der EBV-Infektion nur eine untergeordnete Rolle. Für die Kontrolle einer EBV-Infektion sind in erster Linie T-Zellen von entscheidender Bedeutung.

Die Bedeutung einer funktionierenden T-Zellantwort wird durch zwei Beispiele aus der Klinik deutlich. Erstens werden EBV-assoziierte Erkrankungen in Patienten mit einer angeborenen oder iatrogen induzierten T-Zell dysfunktion mit einer erheblich höheren Inzidenz beobachtet (Rickinson and Kieff, 2006). Zweitens kann eine nach Stammzelltransplantation auftretende PTLD durch die Infusion von polyklonalen, EBV-spezifischen T-Zelllinien erfolgreich behandelt werden (Rooney et al., 1995, Rooney et al., 1998).

T-Zellen erkennen mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors (*T cell receptor*, TCR) Antigen in Form von Peptiden, die von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) präsentiert werden. Zwei Hauptklassen von MHC-Molekülen werden unterschieden: MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC-I), die sich auf nahezu jeder Körperzelle befinden und MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC-II), die nur auf wenigen, hauptsächlich hämatopoetischen Zellen, wie Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen, exprimiert werden. Zusätzlich zum TCR exprimieren T-Zellen die Korezeptoren CD8 oder CD4, die mit den konstanten Regionen von MHC-I bzw. MHC-II interagieren. Aufgrund dessen erkennen CD4⁺ T-Zellen Peptide, die auf MHC-II präsentiert werden, während CD8⁺ T-Zellen Peptide auf MHC-I erkennen (Murphy et al., 2008). Die Beladung von Peptiden auf MHC-I und MHC-II erfolgt durch unterschiedliche Antigenprozessierungs- und Präsentationswege, die im Folgenden kurz erläutert werden (Abbildung 3.2).

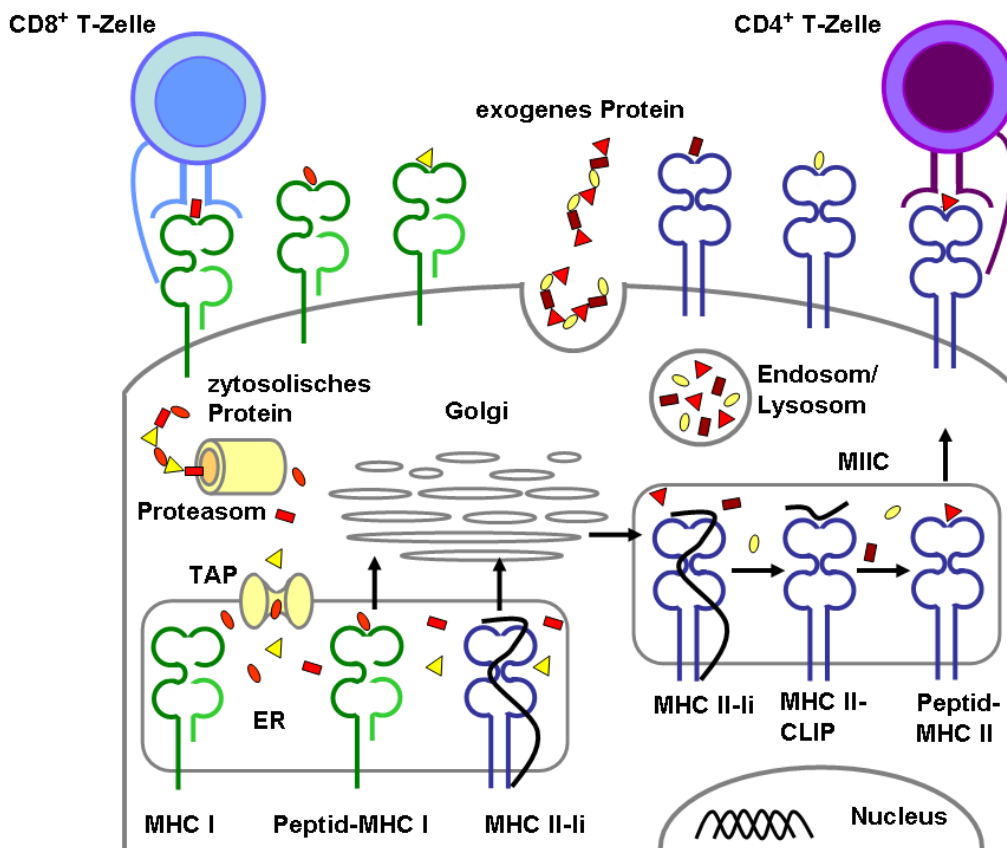


Abbildung 3.2: Klassischer MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg.

Intrazelluläre Proteine werden durch das Proteasom zu Peptiden gespalten und diese über den TAP-Komplex ins Lumen des ER transportiert. Dort binden die Peptide an neu synthetisiertes MHC-I, die Bindung von Peptiden an MHC-II im ER wird durch die invariante Kette (li) verhindert. Mit Peptid beladene MHC-I werden über das Trans-Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden können. Die MHC-II gelangen nach ihrer Synthese im ER in ein endosomales Kompartiment, dem MHC-Klasse-II-Kompartiment (MIIC). Dort findet durch den Abbau der invarianten Kette und der Dissoziation von CLIP die Reifung der MHC-II statt. Exogene Proteine werden durch Endozytose aufgenommen und in Endosomen/Lysosomen durch Proteasen in Peptide gespalten, die dann in das MIIC gelangen, wo sie an reife MHC-II binden können. Die Peptid:MHC-II-Komplexe werden an die Zelloberfläche transportiert und dort den CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Abkürzungen: TAP, *transporter associated with antigen processing*; ER, endoplasmatisches Retikulum; MHC-I, MHC-Klasse-I-Moleküle; MHC-II, MHC-Klasse-II-Moleküle; li, invariante Kette; Golgi, Trans-Golgi-Netzwerk, MIIC, MHC-Klasse-II-Kompartiment; CLIP, *class II invariant chain associated peptide* (verändert nach Heath und Carbone, 2001).

3.8.1 Klassischer MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg

CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T cells*, CTLs) spielen in der Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen, einschließlich Viren, eine entscheidende Rolle. CTLs erkennen Peptide intrazellulärer Proteine, die durch das Proteasom gespalten und über den TAP-Komplex (*transporter associated with antigen processing*, TAP) ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) gelangen. Im ER werden diese Peptide auf MHC-I geladen und über das Trans-Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert. Dort werden sie dann als Peptid:MHC-I-Komplex an CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Erkennt eine CD8⁺ T-Zelle ihr spezifisches Antigen, so kann sie die infizierte Zelle durch direkten Kontakt abtöten. CD8⁺ T-Zellen besitzen mindestens zwei verschiedene zytotoxische Effektormechanismen, um einen programmierten Zelltod (Apoptose) in den erkannten Zielzellen auszulösen: Über die Ausschüttung von lytischen Granula, die Granzyme und Perforin beinhalten, und über die Bindung des Fas-Liganden an Fas auf der Zielzelle, wodurch Apoptose induziert wird. Außerdem produzieren CD8⁺ T-Effektorzellen antivirale Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Murphy et al., 2008).

CD4⁺ T-Zellen sind sogenannte T-Helferzellen, die die Aktivierung von anderen Immunzellen wie Makrophagen, B-Zellen und auch zytotoxische T-Zellen regulieren und dadurch eine zentrale Rolle in der Steuerung der Immunantwort einnehmen. In einigen Fällen können CD4⁺ T-Zellen auch zytotoxische Effektorfunktionen ausüben. Anders als CD8⁺ T-Zellen, die intrazelluläre Antigene erkennen, erkennen CD4⁺ T-Zellen Antigene, die von exogenen Proteinen abstammen. Diese gelangen durch Endozytose in saure Kompartimente, in denen sie durch Proteasen in Peptide gespalten werden. Die Peptide gelangen in ein spezialisiertes, vesikuläres Kompartiment, das MHC-Klasse-II-Kompartiment (MIIC). Dort kommt es zum proteolytischen Abbau der invarianten Kette (Ii) und zur Entfernung des Spaltprodukts CLIP (*class II invariant chain associated peptide*) aus der Peptidbindetasche. Diese reifen MHC-II werden mit Peptiden endozytierter Proteine beladen und über Transportvesikel an die Zelloberfläche transportiert, wo sie von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden können. CD4⁺ T-Zellen differenzieren zu verschiedenen Effektorzellen, die aufgrund ihres Zytokinprofils in verschiedene Gruppen unterteilt werden (Murphy et al., 2008).

3.8.2 Die EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort

Die IM ist durch einen 5- bis 20-fachen Anstieg der CD8⁺ T-Zellzahl im Blut gekennzeichnet (Rickinson and Kieff, 2006). *Ex vivo* Analysen mit MHC-I-Tetrameren haben gezeigt, dass in IM-Patienten etwa 1-5% der gesamten CD8⁺ T-Zellen gegen Epitope von Latenzproteinen gerichtet sind, während bis zu 50% der CD8⁺ T-Zellen Epitope von lytischen EBV Proteinen erkennen (Callan et al., 1998). Innerhalb der Gruppe der Latenzproteine dominiert die Immunantwort gegen Epitope der EBNA-3-Proteinfamilie. Darüber hinaus werden Immunantworten gegen LMP-2, seltener gegen EBNA-1, aber kaum gegen EBNA-2, EBNA-LP oder LMP-1 beobachtet (Rickinson and Kieff, 2006). Innerhalb der lytischen EBV-Proteine dominiert die Immunantwort gegen Epitope der sehr frühen Antigene BZLF1 und BRLF1 und einigen frühen Antigenen wie z.B. BMLF1, BMRF1, BALF2 und BALF5. Im Gegensatz dazu rufen späte lytische Strukturproteine nur eine schwache CD8⁺ T-Zell-Immunantwort hervor (Pudney et al., 2005, Steven et al., 1997).

Nach überstandener Primärinfektion nimmt die Anzahl der EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut ab, CD8⁺ T-Zellen gegen latente und lytische Antigene können aber lebenslang nachgewiesen werden und machen ca. 0,1-1 % der gesamten CD8⁺ T-Zellpopulation (Callan, 2004).

3.8.3 Die EBV-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort

Über die CD4⁺ T-Zellantwort im Rahmen der Primärinfektion mit EBV ist noch wenig bekannt. Die CD4⁺ T-Zellzahl im Blut von IM-Patienten bleibt weitgehend konstant (Williams et al., 2005) und ist selten oligoklonal (Maini et al., 2000). *In vitro* etablierte CD4⁺ T-Zelllinien aus Spendern mit latenter oder akuter EBV-Infektion erkennen ein sehr breites Spektrum an EBV-Antigenen, hauptsächlich des lytischen Zyklus von EBV. Strukturproteine wie BALF4 (gp110), BLLF1 (gp350) und BNRF1 stellen dabei die immundominanten Zielstrukturen der CD4⁺ T-Zellantwort dar (Adhikary et al., 2007).

Diese Immundominanz beruht wahrscheinlich auf der sehr effizienten, CD21-vermittelten Aufnahme von Virionen und der anschließenden Präsentation von Antigenen der Virushülle auf MHC-II. Durch diesen Antigentransfer können Strukturantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen auch nicht-lytisch infizierte Nachbarzellen erkennen. Zudem besitzen diese T-Zellen zytotoxische Kapazität und können dadurch *in vitro* das Wachstum von LCL- und BL-Zelllinien sowie das Auswachsen neu-infizierter B-Zellen hemmen (Adhikary et al., 2006).

Auch Latenzantigen-spezifische, zytotoxische CD4⁺ T-Zellen wurden beschrieben, darunter T-Zellklone mit Spezifität für Epitope von EBNA-1 (Paludan et al., 2002), EBNA-2 (Khanna et al., 1997, Long et al., 2005), EBNA3-C (Long et al., 2005) und LMP-2 (Su et al., 2001).

War anfangs die Bedeutung der CD4⁺ T-Zellen bei einer EBV-Infektion umstritten, so stützen neuere Studien die wichtige Rolle von CD4⁺ T-Zellen in der antiviralen Immunität. Sebelin-Wulf et al. (2007) zeigten, dass eine niedrigere Anzahl von endogenen CD4⁺ T Zellen mit einem höheren Risiko der Entstehung von EBV-assoziierten Erkrankungen in immunsupprimierten Patienten einhergeht. Zudem wurde in einer Phase II-Studie gezeigt, dass PTLD-Patienten ein besseres klinisches Ansprechen zeigten, wenn die verabreichten T-Zelllinien einen höheren CD4⁺ T-Zellanteil aufwiesen (Haque et al., 2007).

3.9 Modulation der Immunantwort durch EBV

Die Fähigkeit zur lebenslangen Persistenz im menschlichen Wirt in Gegenwart einer starken EBV-spezifischen Immunantwort deutet darauf hin, dass das Virus Strategien entwickelt hat, sich der Immunerkennung zu entziehen. Mittlerweile häufen sich Studien, die eine Immunmodulation durch latente und lytische Genprodukte des EBV beschreiben.

3.9.1 Immunevasion in der Latenz

EBV-infizierte B-Zellen exprimieren in der Latenzphase eine begrenzte Zahl an viralen Genprodukten (Kieff and Rickinson, 2006). Die Expression nur weniger viraler Antigene ist ein Hauptmechanismus, um einer Erkennung und Eliminierung durch T-Zellen zu entgehen (Hochberg et al., 2004, Rowe et al., 1986). Darüber hinaus besitzt das in fast allen Latenzformen exprimierte **EBNA1** die Fähigkeit, sich einer CD8⁺ T-Zellerkennung zu entziehen. Eine interne Glycin-Alanin-reiche Sequenz (*glycine-alanine repeat*, GAR) verhindert den proteasomalen Abbau des maturen Proteins und verlängert somit seine Halbwertszeit (Levitskaya et al., 1997). Zudem inhibiert EBNA-1 seine eigene mRNA-Translation und dadurch seine MHC-I-assoziierte Präsentation (Yin et al., 2003, Tellam et al., 2008).

Dagegen wirkt **LMP-1** direkt immunsupprimierend auf T-Helferzellen und induziert regulatorische T-Zellen (T_{reg}) (Dukers et al., 2000). Die nicht-kodierenden **EBERs** indu-

zieren die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in infizierten Zellen (Samanta et al., 2008).

3.9.2 Immunevasion im lytischen Zyklus

Um die Virusvermehrung und -ausbreitung zu gewährleisten, muss eine zumindest sporadische Virusreplikation in gesunden Virusträgern stattfinden. Im lytischen Lebenszyklus von EBV wird das gesamte Repertoire von über 80 lytischen Genprodukten exprimiert (Kieff and Rickinson, 2006). Trotz dieser großen Anzahl an potentiellen T-Zellantigenen kann EBV erfolgreich replizieren. Die Tatsache, dass die CD8⁺ T-Zellantwort gegen sehr frühe und frühe lytische Antigene, nicht aber gegen späte lytische Antigene gerichtet ist, führte zur Hypothese, dass virale Genprodukte die Immunerkennung beeinflussen (Pudney et al., 2005). In den vergangenen Jahren wurden zunehmend Strategien der Immunevasion von lytischen EBV Proteinen entdeckt. Dabei interferieren die viralen Proteine sowohl mit der MHC-I-, als auch mit der MHC-II-abhängigen Antigenprozessierung und –präsentation (Ressing et al., 2008) (Abbildung 3.3.)

3.9.2.1 Modulation des MHC-Klasse-I-Präsentationswegs durch EBV

Das frühe virale Genprodukt **BNLF2a** beeinträchtigt die Präsentation von Antigenen auf MHC-I. *BNLF2a* kodiert für ein 60 Aminosäuren langes Membranprotein, das an den TAP-Komplex bindet und dadurch den Transport von Peptiden in das ER inhibiert (Hislop et al., 2007, Horst et al., 2009). MHC-I, die kein Peptid tragen und an die Zelloberfläche gelangen, sind instabil und werden von der Oberfläche schnell internalisiert. Croft et al. (2009) zeigten, dass durch die Deletion von BNLF2a lytisch infizierte B-Zellen besser von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden als lytisch infizierte B-Zellen, die das Wildtyp-EBV tragen. Dabei war aber nur die Erkennung von sehr frühen und frühen lytischen Antigenen besser, nicht aber die von späten lytischen Antigenen. Dies spiegelt die transiente Expression von BNLF2a wider, die sechs Stunden nach Induktion ihren Höhepunkt erreicht und dann wieder abnimmt (Croft et al., 2009).

BILF1 und seine Fähigkeit MHC-I herunterzuregulieren, wurde bei einem systematischen *screen* von lytischen Genen entdeckt (Zuo et al., 2009). *BILF1* kodiert für einen Rezeptor mit sieben Membrandurchgängen, der strukturelle und funktionelle Eigenschaften von viralen G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren (vGPCR) aufweist (Beisser et al., 2005). Es ist bislang der erste vGPCR von humanen Herpesviren, der die Fähigkeit besitzt, mit dem MHC-I-Präsentationsweg zu interferieren. Im Gegensatz zu BNLF2a bindet BILF1 an MHC-I an der Zelloberfläche und induziert ihren lysosomalen Abbau (Zuo et al., 2009).

BGLF5 kodiert für eine, unter allen Herpesviren hoch konservierte, alkalische Exonuklease (Baylis et al., 1989, Knopf and Weissbart, 1990, Sheaffer et al., 1997). BGLF5 ist an der viralen DNA-Synthese, der Verpackung des viralen Genoms und am nukleären Egress des Virus beteiligt und deshalb essentiell für die Produktion infektiöser EBV-Partikel (Feederle et al., 2009a). Rowe et al. (2007) konnten darüber hinaus noch eine „*shutoff*“-Funktion nachweisen, die auf der Ebene von mRNA-Transkripten wirkt und die Translation von zellulären Proteinen hemmt (Rowe et al., 2007). Durch die Inhibition der Synthese von MHC-I reduziert BGLF5 die Antigenpräsentation an CD8⁺ T-Zellen (Zuo et al., 2008).

Das späte lytische EBV-Gen **BCRF1** kodiert für ein IL-10-Homolog, das auch als virales IL-10 (vIL-10) bezeichnet wird (Moore et al., 1990). Die Behandlung von primären B-Zellen mit rekombinantem vIL-10 führt zu einer Abnahme der TAP-Expression auf mRNA- und Proteinebene (Zeidler et al., 1997). Dadurch können EBV-infizierte B-Zellen weniger Peptide in das ER-Lumen transportieren, was zu einer schlechteren Erkennung von infizierten Zellen führt. Außerdem hemmt vIL-10 die Expression von b1i/LMP2, einer Untereinheit des Immunproteasoms (Zeidler et al., 1997). Dies könnte womöglich zu einer eingeschränkten Funktion oder veränderten Spezifität des Proteasoms und damit zu einer verminderten Produktion immunogener Peptide führen.

Das sehr frühe Gen **BZLF1** bewirkt eine Abnahme von MHC-I-Transkripten und eine Herunterregulation des IFN- γ -Rezeptors (Morrison et al., 2001). Wie BZLF1 dies mechanistisch bewerkstelligt, ist noch weitgehend unbekannt.

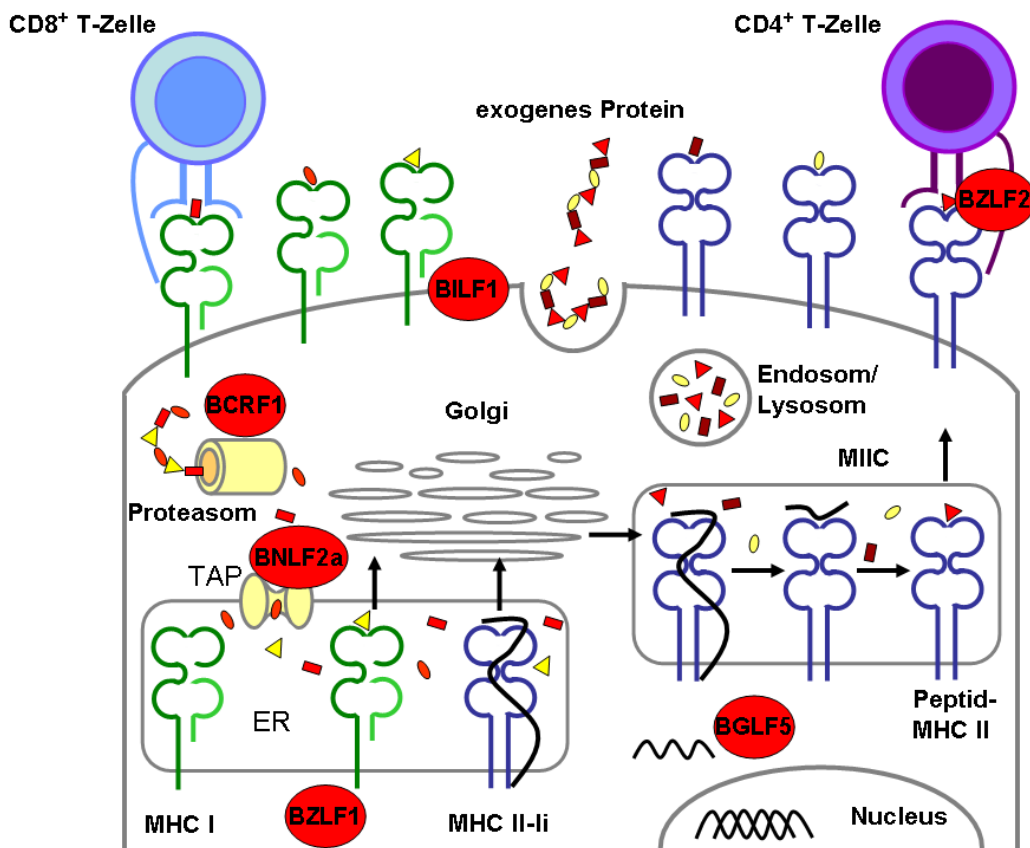


Abbildung 3.3: Modulation der MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationswege durch lytische EBV-Proteine. BCRF1 inhibiert die Expression von TAP und einer Untereinheit des Proteasoms. Dadurch können weniger Peptide ins ER transportiert werden. BNLF2a blockiert über die Bindung an TAP den Transport von Peptiden ins ER. BILF1 induziert die Endozytose und den lysosomalen Abbau von MHC-I. BGLF5 hemmt die Proteinsynthese von MHC-I und MHC-II durch seine *shutoff* Funktion. BZLF1 führt durch einen bislang unbekannten Mechanismus zur Herunterregulation von MHC-I und MHC-II. BZLF2 bindet an MHC-II und interferiert sterisch mit der T-Zell-Erkennung auf der Zelloberfläche von infizierten Zellen. Abkürzungen: TAP, *transporter associated with antigen processing*; ER, endoplasmatisches Retikulum; MHC-I, MHC-Klasse-I-Moleküle; MHC-II, MHC-Klasse-II-Moleküle; li, invariante Kette; Golgi, Trans-Golgi-Netzwerk; MIIC, MHC-Klasse-II-Kompartiment; CLIP, *class II invariant chain associated peptide* (verändert nach Heath und Carbone, 2001).

3.9.2.2 Modulation des MHC-Klasse-II-Präsentationswegs durch EBV

Die Modulation der CD4⁺ T-Zellantwort durch EBV ist weniger gut untersucht. Dennoch wurde festgestellt, dass die Expression des sehr frühen Genprodukts BZLF1 (Li et al., 2009) und auch des frühen Genprodukts BGLF5 (Rowe et al., 2007) zu einer Abnahme der MHC-II-Transkripte und dadurch zu einer Hemmung der Antigenpräsentation führt. Zudem wurde gezeigt, dass das späte virale Protein **BZLF2 (gp42)** sterisch mit der TCR-Erkennung interferiert (Ressing et al., 2003, Ressing et al., 2005).

3.10 Immuntherapie

Die in EBV-positiven Tumoren exprimierten viralen Genprodukte stellen potentielle Zielstrukturen für Antigen-spezifische, immuntherapeutische Ansätze dar. Erste Hinweise auf eine T-Zellkontrolle EBV-positiver Tumoren *in vivo* lieferten die klinischen Beobachtungen, dass die PTLD Inzidenz in Transplantationspatienten mit dem Grad der Immunsuppression korreliert und dass eine Reduzierung der Immunsuppression häufig zu einer Regression der Tumoren führt. Auch eine Behandlung der PTLD nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT) mit Spender T-Zellen erwies sich als klinisch wirksam. Jedoch führte diese Donorlymphozyteninfusion (DLI) auch zur Entstehung der unerwünschten Spender-gegen-Wirt Erkrankung (*graft-versus-host-disease*, GvHD).

Um diese oftmals lebensbedrohliche Komplikation zu vermeiden, wurden die infundierten T-Zellen *in vitro* vorselektioniert. Dazu wurden die peripheren T-Zellen des Stammzellspenders wiederholt mit autologen LCL, die wie PTLD-Zellen alle neun EBV-Latenzgene exprimieren, stimuliert. Mit Hilfe dieser EBV-spezifischen Spender-T-Zelllinien gelang sowohl die Prophylaxe als auch die Therapie von PTLD nach allogener HSCT (Rooney et al., 1998). Diese polyklonalen T-Zellpräparate enthalten CD8⁺ und CD4⁺ T-Zell-Komponenten und vermutlich tragen beide Komponenten zur klinischen Wirksamkeit bei (Smith et al., 1995). Aufgrund des aufwändigen und langwierigen Herstellungsverfahrens sind passende Präparate allerdings bislang nur für ausgewählte Hochrisikopatienten und nur an wenigen Spezialeinrichtungen verfügbar. Ein besonderes therapeutisches Dilemma stellen Virusinfektionen nach allogener HSCT von einem EBV-negativen Spender dar. Hierfür stehen partiell HLA-identische, EBV-spezifische T-Zellen aus einer vorgehaltenen T-Zellbibliothek zu Verfügung. Allerdings birgt die Behandlung mit diesen allogenen T-Zellen ein potentiell hohes Risiko für unerwünschte immunologische Nebenwirkungen (Haque et al., 2002, Haque et al., 2007).

Auch bei PTLD nach Organtransplantation (*solid organ transplantation*, SOT) werden autologe T-Zellimpfstoffe eingesetzt. Aufgrund der medikamentös bedingten Immunsuppression der betroffenen Patienten ist ihre Herstellung in der Regel schwieriger und der therapeutische Effekt meist geringer und/oder transient. Bei der Behandlung EBV-positiver Malignome in immunkompetenten Patienten wurden mit LCL-stimulierten T-Zelllinien bislang nur geringe Erfolge erzielt (Comoli et al., 2002). LCL-stimulierte T-Zellpräparate sind oftmals gegen immundominate Antigene der EBNA3-Proteinfamilie gerichtet, die in diesen Tumoren nicht exprimiert werden. In neueren Ansätzen wird deshalb eine selektive Gabe von T-Zellen angestrebt, die ausschließlich gegen die in

den Tumoren exprimierten viralen Antigene gerichtet sind. Wesentliche Voraussetzung für die weitere Entwicklung der EBV-spezifischen Immuntherapie ist somit die Kenntnis geeigneter Zielstrukturen sowie viraler Mechanismen der Immunevasion.

3.11 Fragestellung

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen mit Spezifität für späte lytische Antigene latent und frisch EBV-infizierte B-Zellen direkt nach Virusaufnahme erkennen und eliminieren können (Adhikary et al., 2007, Adhikary et al., 2006). Ob Virus-spezifische CD4⁺ T-Zellen darüber hinaus in der Lage sind, lytisch infizierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren, bevor infektiöse Viruspartikel freigesetzt werden, und ob Genprodukte des lytischen Zyklus mit der Immunerkennung interferieren, ist bislang nicht bekannt. Eine frühzeitige Elimination lytisch infizierter Zellen würde eine weitere Kontrolle über die Virusausbreitung und somit über die Viruslast bedeuten, welche bei immunsupprimierten Patienten mit dem Risiko für EBV-assoziierte Komplikationen korreliert. Um diese Fragen zu beantworten, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein konditionales, lytisches Zellsystem etabliert werden und durch die synchrone Induktion des lytischen Zyklus in diesen Zellen die sequentielle, MHC-II-restringierte Erkennung im Verlauf des lytischen Zyklus von EBV analysiert werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob lytische Genprodukte von EBV mit der Antigenprozessierung und -präsentation in LCL interferieren.

4 Materialien

4.1 Zelllinien

B95.8 ist eine durch EBV-Infektion von B-Zellen aus Krallenaffen entstandene B-Zelllinie (Miller et al., 1972).

LCL sind humane B-Zellen, die durch EBV-Infektion *in vitro* transformiert wurden. LCL Z(-) sind ebenfalls humane B-Zellen, die mit einer BZLF1-Deletionsmutante (B95.8 ΔBZLF1) von EBV generiert wurden. LCL Z(-) unterscheiden sich phänotypisch nicht von LCL, können aber keine lytischen Genprodukte exprimieren und folglich auch keine Virionen produzieren.

DG75, Raji und KEM sind BL-Zelllinien. Dabei ist DG75 eine EBV-negative (Ben-Sasson and Klein, 1981) und KEM eine EBV-positive BL-Zelllinie. Raji ist eine EBV-positive BL-Zelllinie, wobei das Virusgenom in dieser Zelllinie eine Deletion aufweist, so dass keine Viruspartikel gebildet werden können.

HEK293 (*Human Embryonic Kidney*, HEK) ist eine humane embryonale Nierenzelllinie, die durch Einführung der Gene *E1a* und *E1b* von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham et al., 1977). HEK293T ist eine Variante dieser Zelllinie, die zusätzlich das T-Antigen des SV40-Virus exprimiert (Pear et al., 1993).

Der HLA-Genotyp ist abhängig vom jeweiligen Spender und wurde bestimmt, um passende antigenpräsentierende Zelllinien zur spezifischen Stimulation von T-Zellen einsetzen zu können.

Tabelle 4.1: HLA-Genotyp der Zelllinien

LCL und LCL Z(-) verschiedener Spender								
Linie	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DPB1	HLA-DPβ	HLA-DRB3*, 4, 5
LCL 1.11	0201, 6601	1801, 4102	1203, 1701	1303, 1501	0301, 0602	0301, 0402	0301, 0402	DRB3* 0101 DRB5* 0101
LCL GB	0101	1501	0304; 0602	1101; 1301	0301; 0603	0401, 0402	0401, 0402	DRB3* 0202
LCL JM, LCL Z(-) JM	0201, 0301	1529, 5101	1203, 1402	0801, 1301	0402, 0603	0401, 1301	0401, 1301	DRB3* 01011

LCL Z(-) Fz	0201, 2301	4402, 4403	0401, 0501	0701, 1201	0202, 0301	0201	0201	DRB3* 0202 DRB4* 0101
LCL Z(-) MF	0101; 0201	1801; 5101	0501; 1502	0801; 1201	0301; 0402	0401	0401	DRB3* 0202
LCL Z(-) Pt	0301, 6601	4901	0701	1302, 1601	0502, 0604	1301	1301	DRB3* 0301 DRB5* 0202
LCL Z(-) SG	2402, 6801	2705, 5701	0202, 0602	0401, 1103	0301	0401	0401	DRB3* 0202 DRB4* 0103
LCL Z(-) TG	2301, 2402	0702, 0705	0702, 1505	0101, 1401	0501, 0503	0402	0402	DRB3* 0202
Burkitt-Lymphom Zelllinien								
Linie	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DPB1	HLA-DPB	HLA-DPB3, 4, 5
DG75	0201, 6601	4101, 5001	0602, 17	0404, 1301	0402, 0603	0401	0401	DRB3*0 101 DRB4*0 103
KEM	3004, 3202	1510, 4012	0304, 0404	0101, 1201	0501	0602	0602	DRB3*0 202
Raji	0301	1510	0304, 0401	0301, 1001	0201, 0501	0101	0101	DRB3*0 202

Tabelle 4.2: Spezifität und Restriktion der verwendeten T-Zellen. AA = amino acid

T-Zellklon	Antigen	Epitop	HLA-Restriktion
BLLF1-H2	BLLF1	AA ₁₃₀₋₁₄₄ -VYFQDVFGTMWCHHA-	HLA-DQB1*0402
BLLF1-D6	BLLF1	AA ₆₅₋₇₉ -FGQLTPHTKAVYQPR-	HLA-DRB1*1301
BMLF1-ML2	BMLF1	AA ₂₅₉₋₂₆₇ -GLCTLVAML-	HLA-A*0201
BMRF1-MR13	BMRF1	AA ₂₀₇₋₂₁₆ -TLDYKPLSV-	HLA-A*0201
GB EBNA3C-3H10	EBNA3C	AA ₆₂₇₋₆₄₀ -VVRMFMRERQLPQS-	HLA-DRB1*1101

IM1-1G12	BcLF1	AA ₆₂₋₇₂ -AIQYVRFLETA-	HLA-DP*0401
JM BNRF1-1H7	BNRF1	AA ₅₄₈₋₅₆₁ -LGGLNFVNDLASPV-	HLA-DRB3*0101
T-Zelllinie	Antigen	Epitop	HLA-Restriktion
BZLF1-Lg	BZLF1	AA ₁₂₂₋₁₃₀ -VQTAAAVVF	HLA-B*1501
GB-CD4	BNRF1	AA ₁₀₀₆₋₁₀₁₇ -VSDYGYNEALAV	HLA-DRB3*0202
JM LMP2A-CD8	LMP2A	AA ₃₅₀₋₃₅₈ LLWTLVVLL	HLA-A*0201

4.2 Bakterienstämme

In diesen Untersuchungen wurde ausschließlich der *E. coli*-Stamm XL1-*blue* MRF⁺ (Stratagene) verwendet.

4.3 Plasmide

Tabelle 4.3: Verwendete Plasmide. Abkürzungen: Tet, Tetrazyklin; Ery, Erythromycin

Plasmid	Eigenschaft	Resis- tenz	Referenz
pCMV-gp350-His	BLLF1-Expressionsplasmid	Amp ^R	Adhikary et al. 2007
BZLF1-TxER-IRES-NGFR-CD2-Tet-GFP	BZLF1-Östrogenrezeptor-Fusionsprotein unter Tet-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
Tet-Ery-BZLF1-IRES-NGFR-IV	BZLF1 unter Tet-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	BZLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A	LMP2A unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
ICP47-Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A	ICP47 unter Tet-Promotor, LMP2A unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
BGLF5-Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A	BGLF5 unter Tet-Promotor, LMP2A unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
BILF1-Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A	BILF1 unter Tet-Promotor, LMP2A unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
BZLF2-Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A	BZLF2 unter Tet-Promotor, LMP2A unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
Tet-Ery-Doxy-NGFR-EBNA3C	EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit

ICP47-Tet-Ery-Doxy-NGFR-EBNA3C	ICP47 unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
BGLF5-Tet-Ery-Doxy-NGFR-EBNA3C	BGLF5 unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
BILF1-Tet-Ery-Doxy-NGFR-EBNA3C	BILF1 unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
BZLF2-Tet-Ery-Doxy-NGFR-EBNA3C	BZLF2 unter Tet-Promotor, EBNA3C unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	BZLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
ICP47-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	ICP47 unter Tet-Promotor, BZLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
BGLF5-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	BGLF5 unter Tet-Promotor, BZLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
BILF1-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	BILF1 unter Tet-Promotor, BZLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit
BZLF2-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	BZLF2 unter Tet-Promotor, BZLF1 unter Ery-Promotor	Amp ^R	vorliegende Arbeit

4.4 DNA-modifizierende Enzyme

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Restriktionsenzyme sowie T4-DNA-Polymerase, CIP (*calf intestine phosphatase*), T4-DNA-Ligase und die dazugehörigen Puffer von New England Biolabs und MBI Fermentas bezogen.

4.5 Antikörper

Tabelle 4.4: Antikörper. Abkürzungen: WB, Western-Blot; MACS, magnetische Zellsortierung; HRP, *horseradish peroxidase*

Ungekoppelte Primärantikörper			
Spezifität	Wirt	Anwendung	Firma
anti-BGLF5	Kaninchen	WB	Zur Verfügung gestellt von R. Feederle (DKFZ, Heidelberg)
anti-BMRF1	Maus	WB	Abcam
anti-BNLF2a	Ratte	WB	Zur Verfügung gestellt von A. B. Rickinson (Birmingham, UK)
anti-BRLF1	Maus	WB	Argene
anti-BZLF1	Maus	WB	Argene
anti-EBNA3C	Maus	WB	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von B. Kempkes (HMGU, München)
anti-LMP2A	Ratte	WB	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von E. Kremmer (HMGU, München)
anti-NGFR	Maus	MACS	Hybridomüberstand; zur Verfügung gestellt von E. Kremmer (HMGU, München)
anti-ZEB1	Kaninchen	WB	Santa Cruz
Gekoppelte Sekundärantikörper			
Spezifität	Wirt	Kopplung	Firma
anti-Maus-IgG	Schaf	HRP	Amersham
anti-Ratte-IgG+IgM	Ziege	HRP	Jackson
anti-Kaninchen-IgG	Ziege	HRP	Jackson

4.6 Zytokine

Tabelle 4.5: Zytokine

Zytokin	Konzentration	Firma
Humanes IL-2 (Proleukin)	1.000.000 U/ml in PBS	Chiron-Novartis

4.7 Chemikalien

Tabelle 4.6: Chemikalien

Chemikalien	Firma
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Erythromycin	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Doxyzyklin	Sigma-Aldrich
Ethanol p.A.	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Glycerin	Merck
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Methanol	Merck
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich
Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Phytohämagglutinin (PHA)	Murex
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich
Propidiumjodid (PI)	Sigma-Aldrich
Tamoxifen	Sigma-Aldrich
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck
Triton X-100	Merck
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Merck
Valproinsäure (VPA)	Sigma-Aldrich

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Qualität p.A. eingesetzt. Nicht erwähnte Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich oder Roth verwendet. Weitere Reagenzien wurden von den Firmen Becton-Dickinson (BD), Bio-Rad, GE Healthcare, Integra, Invitrogen, MBI-Fermentas, Millipore, New England Biolabs, Neolab, Perkin Elmer, Promega, Qiagen, Roche und Stratagene bezogen. Einige zusätzliche Bezugsquellen werden auch im Methodenteil aufgeführt.

4.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4.7: Verbrauchsmaterial/-flüssigkeiten

Material	Firma
Select Agar	Invitrogen
Agarose	Invitrogen
AIM-V	Invitrogen
Amicon Ultra-15 Zentrifugal-Filter-Einheiten	Millipore
<i>buffy coats</i>	Blutspendezentrale Ulm
96-Loch-Platten	Corning Incorporated
<i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i> <i>Development System</i> Human GM-CSF Human IFN γ	R&D Systems
Filter 0,45 und 0,22 μ m	Millipore
Fötales Kälberserum; FCS (<i>fetal calf serum</i>)	PAA
Fungizone	Gibco BRL
Gentamycin	Gibco BRL
Glycin	Merck
HEPES 1 M	Gibco BRL
humanes Serum	Aus humanem peripheren Blut freiwilliger Spender
L-Glutamin, 200 mM	Gibco BRL
gestopfte Pipettenspitzen	ART Molecular Bio Products
MACS-Separationssäulen LS	Miltenyi Biotec
Magermilchpulver	Merck
Natrium-Heparin	Braun
Natriumpyruvat	Gibco BRL
Nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA)	Gibco BRL
Parafilm „M“	American National Can
Pancoll	Pan Biotech
Polystyren-Zellkulturschalen	BD-Falcon
Reaktionsgefäße (15 und 50 mL)	BD-Falcon und Sarstedt
RPMI 1640	Gibco BRL
Trypsin-EDTA	Gibco BRL
Zellkulturflaschen	Greiner-Bio-One
Zellkulturplatten	BD-Falcon
Zellkulturschalen	Nunc

Nicht angeführte Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Falcon, Nunc, BD, Sarstedt und Greiner bezogen.

4.9 Medien, Puffer und Lösungen

4.9.1 Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 4.8: Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen

ELISA-Blockpuffer	PBS 1 % BSA 5 % Sucrose 0,05 % NaN ₃
ELISA-Waschpuffer/ PBS-T	PBS 0,05 % Tween-20
FACS-Waschpuffer	PBS 2 % FCS 0,05 % NaN ₃
MACS-Puffer	PBS 1 % BSA 2 mM EDTA
Luria-Bertani (LB)-Medium	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl ad 1l H ₂ O dest. autoklaviert
PBS	154 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS-T	PBS 0,05 % Tween-20
Reagent diluent (RD)	PBS 1 % BSA sterilfiltriert
SOB-Medium	20 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 0,5 g NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄

	ad 1l H ₂ O dest. autoklaviert
SOC-Medium	SOB-Medium 0,2 % Glucose sterilfiltriert
Superbroth-Medium	32 g Trypton 20 g Hefe-Extrakt 25 g NaCl ad 1l H ₂ O dest. autoklaviert
TBS	50 mM Tris pH 8 137 mM NaCl 2,7 mM KCl
TBS-T	TBS 0,05 % Tween-20
TE	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA in H ₂ O pH 7,5

Sämtliche Chemikalien, die für die Herstellung von Puffern und Lösungen verwendet wurden, wurden von Fluka, Merck, Sigma oder Roth in Analysequalität bezogen. Puffer oder Lösungen, die nur bei einer bestimmten Methode zur Anwendung kamen, werden ausschließlich bei der entsprechenden Methode erwähnt und beschrieben.

4.9.2 Zellkulturmedien

Tabelle 4.9: Zellkulturmedien

DMEM (Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium) -Komplettmedium	DMEM 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 1 % Fungizone 50 µg/ml Gentamycin
Einfriermedium	90 % FCS 10 % DMSO
RPMI 1640-Komplettmedium/ LCL-Medium	RPMI 1640 10 % FCS 1 % Fungizone 50 µg/ml Gentamycin 2 mM L-Glutamin

	1 mM Na-Pyruvat 1 % nicht-essentielle Aminosäuren
T-Zell-Medium (+/- IL-2)	AIM-V 10 % humanes Serum (hitzeinaktiviert) 2 mM L-Glutamin 10 mM HEPES optional 10 U/ml IL-2
Waschmedium	RPMI 1640-Medium ohne Zusätze

4.10 Geräte

Tabelle 4.10: Geräte

Gerät	Firma
Bio Photometer plus	Eppendorf
Bestrahlungsanlage	Gammacell 40 der Firma AECL mit Cäsium-137 (γ-Strahler)
Brutschrank	Forma Scientific, Inc Jacketed Incubator
ELISA-Lesegerät	Tecan
FACS Aria	Becton Dickenson
FACS Calibur	Becton Dickenson
Falcon-Roller	Coulter Electronics Limited
Gefrierschrank -80°C	Colora bzw. Thermo
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop / Axioskop	Zeiss
Luminometer Orion	Berthold Detection Systems
Millipore-Anlage	Millipore
Netzgerät Power PAC 300	Bio-Rad
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
pH-Messgerät	Knick
Pipetten	Gilson und Rainin
Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Schüttelinkubatoren	New Brunswick Scientific
Sterilbank	BDK
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
UV-Transluminator	UVP Inc.
Vortexer Genie 2	Scientific Industries

Zentrifugen	Beckman, Eppendorf, Hettich, Sorvall und Thermo
NEON Transfektionsgerät	Invitrogen
GenePulser II	Bio-Rad

4.11 Software

Adobe Illustrator CS3

Adobe Photoshop CS3

Cell Quest

Clone Manager Basic 8

Endnote X4

Microsoft Excel

Microsoft Word

5 Methoden

5.1 Mikrobiologische Methoden

5.1.1 Kultivierungsverfahren

Als Standardmedium für die Anzucht des *E. coli*-Stamm XL1-*blue* MRF' wurde LB-Medium verwendet (Tabelle 4.8). Die Anzucht der Zellen erfolgte aerob bei 37°C. Mit Plasmiden transformierte Bakterien wurden in Gegenwart von Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (25 µg/ml) in Fest- oder Flüssigmedium kultiviert. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Bio-Photometer (Eppendorf) bestimmt.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Isolation kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präp) erfolgte aus einer Übernachtskultur. Hierfür wurde 1 ml der Bakteriensuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 4.600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Bakterien in 100 µl E1 Suspensions-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl E2 Puffer zur Lyse der Bakterienzellen dazugegeben und für 2-3 min inkubiert. Danach erfolgte eine Neutralisation mit 100 µl E3 Puffer und eine Zentrifugation für 20 min bei 18.000 x g und 4°C. Hierbei wurden die zellulären Fragmente, die bei der Lyse entstanden waren, sedimentiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 800 µl Ethanol und anschließender Zentrifugation für 20 min bei 18.000 x g und 4°C wurde die DNA gefällt. Der Überstand wurde abgekippt und das DNA-Pellet getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde anschließend in 100 µl H₂O gelöst. Ein Aliquot der Plasmid-DNA wurde zur Überprüfung mit Restriktionsenzymen verdaut.

Puffer E1:

50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

Puffer E2:

200 mM NaOH; 1 % SDS

Puffer E3:

3,1 M Kaliumacetat (pH 5,5)

Tabelle 5.1: Ansatz des Restriktionsverdaus

Plasmid-DNA	17 µl
10x Puffer	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl

5.2.2 Isolation großer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Herstellung großer Mengen Plasmid-DANN (Maxi-Präp) erfolgte mittels „JetStar 2.0-Kit“ der Firma Genomed. Dafür wurden 400 ml Superbroth-Medium, welches mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt war, mit der gewünschten Bakterienkolonie angeimpft. Nach Inkubation über Nacht (üN) bei 37°C im Schüttelinkubator wurden 900 µl der Bakteriensuspension entnommen, mit 900 µl Einfriermedium vermischt und bei -80°C gelagert. Die restliche Kultur wurde für 10 min bei 4.600 x g sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml E1-Puffer resuspendiert und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Suspensionspuffer enthielt RNaseA damit sichergestellt wurde, dass keine RNA mit aufgereinigt wurde. Zur Lyse der Zellen wurde 10 ml E2-Puffer hinzugegeben und für 5 min bei leichtem Schwenken inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die Auflösung der Zellmembran durch SDS und die Denaturierung von Proteinen, Plasmid-DNA und chromosomaler DNA. Nach Neutralisation durch Zugabe von 10 ml E3-Puffer wurde der Ansatz für 20 min bei 7.000 x g und 4°C zentrifugiert. Währenddessen wurde eine Maxi-Säule mit 20 ml E4-Puffer äquilibriert. Der Überstand des Bakterienlysats wurde nach der Zentrifugation auf die Säule gegeben und danach dreimal mit je 20 ml E5-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 15 ml E6-Puffer eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation für 20 min bei 7.000 x g und 4°C. Das DNA-Pellet wurde daraufhin getrocknet und in 1 ml TE-Puffer gelöst. Die Ausbeute an Plasmid-DNA wurde durch die Ermittlung der DNA-Konzentration am Bio-Photometer (Eppendorf) (Wellenlänge 260 nm) bestimmt. Zur Überprüfung der Plasmid-DNA wurde diese in fünf Ansätzen mit jeweils unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten, und die Restriktionsfragmente durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

Einfriermedium

LB-Medium; 40 % Glycerin

Puffer E4:

100 mM Natriumacetat (pH 5,0); 600 mM NaCl; 0,15 % Triton-X-100 in H₂O

Puffer E5:

100 mM Natriumacetat (pH 5,0); 800 mM NaCl in H₂O

Puffer E6:

100 mM Natriumacetat (pH 5,0); 1500 mM NaCl in H₂O

TE Puffer:

10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA in H₂O

5.2.3 Schneiden der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mittels Restriktionsverdau wurde unter den vom jeweiligen Hersteller empfohlen Bedingungen durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgte die Spaltung bei entsprechender Temperatur für 1-2 h. Dabei wurden sowohl Einzel- als auch Doppelspaltungen für analytische und präparative Zwecke durchgeführt. Bei Doppelspaltungen mit Enzymen, die unterschiedliche Puffer benötigten, wurde die DNA nach dem ersten Verdau durch Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 5.2.5) gereinigt, mit Ethanol gefällt und anschließend der zweite Verdau durchgeführt. Linearisierte Vektoren wurden zu Verhinderung einer Religation mit Alkalischer Phosphatase behandelt. Der Erfolg der Spaltung wurde auf einem Agarosegel überprüft.

Tabelle 5.2: Ansatz für den Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA	1 µg
10x Puffer	2 µl
Enzym	3-5 U
H₂O	ad 20 µl

5.2.4 Synthese von glatten Enden nach dem Restriktionsverdau

Durch die T4-DNA-Polymerase, die sowohl eine Exonukleaseaktivität in 3'-5'-Richtung sowie eine Polymeraseaktivität in 5'-3'-Richtung besitzt, ist es möglich, partiell einzelsträngige DNA-Enden nach Restriktionsverdau in doppelsträngige, „glatte“ Enden umzuwandeln. Dazu wurde direkt nach dem Schneiden der Plasmid-DNA T4-DNA Polymerase und dNTPs zum Reaktionsansatz gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10-15 min bei Raumtemperatur erfolgte der Reaktionsstopp durch eine Phenol-Chloroform-Behandlung (siehe 5.2.5).

Tabelle 5.3: Ansatz für die Synthese von glatten Enden mit T4-DNA-Polymerase

Restriktionsverdau	20 µl
dNTP (je 10 mmol)	1 µl
T4-DNA-Polymerase (5 U/µl)	1 µl

5.2.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion wird durchgeführt, um DNA bzw. RNA von Proteinen zu trennen, beispielsweise nach T4-DNA-Polymerase Behandlung oder zur Inaktivierung von Restriktionsenzymen. Dazu wurde zu dem jeweiligen Reaktionsansatz das gleiche Volumen Phenol und Chloroform zugegeben und gemischt. Darauf erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 18.000 x g und 4°C, wodurch sich zwei Phasen bildeten. Die obere, wässrige Phase, die die DNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5-fachem Volumen an Ethanol versetzt. Durch erneute Zentrifugation für 15 min bei 18.000 x g und 4°C wurde die DNA gefällt. Das DNA-*Pellet* wurde getrocknet und abschließend in Wasser gelöst.

5.2.6 Ligation

Im Ligationsschritt werden der Vektor und das *Insert* mit Hilfe der T4-DNA-Ligase zu einem DNA-Ring zusammengefügt. Die T4-DNA-Ligase kann sowohl glatte als auch überhängende Enden durch Ausbildung einer neuen Phosphodiesterbindung verknüpfen. Vektor und *Insert* wurden im Verhältnis 1:3 eingesetzt. Die Reaktion erfolgte im Wasserbad bei 16°C für mindestens 2 h oder üN. Anschließend wurden Bakterien mit 1 µl der Ligation transformiert (siehe 5.2.11).

Tabelle 5.4: Ansatz der Ligation

Vektor -DNA	2 µl
<i>Insert</i> -DNA	6 µl
T4-DNA-Ligase (40U/µl)	1 µl
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	1 µl

5.2.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 1,0 % Agarose (w/v) in TAE-Puffer verwendet, die mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt waren. Vor dem Lauf wurde die DNA mit Ladepuffer versehen. Zur Bestimmung der DNA Fragmentgrößen diente der Größenmarker „Gene Ruler 1 kb DNA Ladder“ (MBI Fermentas). Der Gellauf wurde in einer Gelkammer für 30-120 min bei 120 V oder üN bei 20 V durchgeführt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte auf einem UV-Transilluminator bei 253 nm und die Dokumentation der Gele mit einer Fotodokumentationsanlage.

5.2.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach Gelelektrophorese zu identifizieren und zu extrahieren, wurde die DNA durch langwelliges UV-Licht (Wellenlänge 365 nm) sichtbar gemacht, um mögliche UV-bedingte Schäden zu vermindern. Das entsprechende Gelstück wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß gegeben und mittels peq-GOLD Gel-Extraktions-Kit der Firma peqlab isoliert. Dazu wurde das Gewicht des Gelstücks bestimmt und die gleiche Menge an Binde-Puffer XP2 zugesetzt. Anschließend wurde das Gel bei 55-65°C im Heizblock unter wiederholtem Vortexen gelöst. Danach wurde die gesamte Probe, aber maximal 750 µl, auf die HiBind-DNA-Säule geladen und für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Die DNA band hierbei an die Silikamembran der Säule und der Durchlauf konnte verworfen werden. Danach erfolgten zwei Waschschriffe mit jeweils 600 µl SPW-Puffer (1 Minute bei 10.000 x g), um Kontaminationen zu entfernen. Anschließend wurde die Säule für 1 min bei 10.000 x g trockenzentrifugiert und die DNA durch Zugabe von 30 µl Wasser und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 5.000 x g in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mit einem Aliquot in einem Agarosegel überprüft, wobei auch die Konzentration der isolierten DNA durch den Vergleich mit ebenfalls aufgetragener Referenz-DNA bekannter Konzentration abgeschätzt werden konnte.

5.2.9 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von doppelsträngiger DNA erfolgte nach dem Prinzip des *cycle sequencing*, welches auf dem nach Sanger et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruchverfahren mit Di-Desoxynukleotiden basiert. Die Sequenzanalyse und -auswertung erfolgte durch den Sequenzierservice Sequiserve (Vaterstetten) oder GATC Biotec (Konstanz).

5.2.10 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA erfolgte mittels Elektroporation. Zur Herstellung von elektrokompetenten Bakterien wurde 5 ml einer Übernachtskultur des Bakterienstamms XL1-*blue* MRF' 1:100 in 500 ml SOB-Medium, das 10 µg/ml Tetrazyklin enthielt, aufgenommen. Die Kultur wurde aerob bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,5-0,7 kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien zuerst für 15 min auf Eis abgekühlt und dann für 15 min bei 4.800 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zelniederschlag in 250 ml kaltem 10%-igen Glycerin in Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspendierung in 250 ml 10% Glycerin wurden die Bakterien sedimentiert, in 2-4 ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert und Aliquots von je 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C (Chung et al., 1989).

5.2.11 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Die Transformation der Bakterien erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden 20 µl der auf Eis aufgetauten, elektrokompetenten Bakterien mit 1 µl des Ligationsansatzes oder Plasmid-DNA versetzt. Nach Überführung in eine vorgekühlte Elektroporationskuvette (Spaltbreite 1 mm) erfolgte die Transformation bei 1500 Volt, 25 µF und 100 Ω. Anschließend wurden die Bakterien sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf geeigneten Selektionsnährböden, meist LB-Agarplatten mit Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin), ausplattiert. Bei Plasmidtransformationen wurden 100 µl des Transformationsansatzes ausplattiert. Bei Transformationen mit Ligationsansätzen wurden die Zellen pelletiert und der gesamte Ansatz in einem Volumen von 100 µl ausplattiert. Es folgte eine Inkubation der Platten üN bei 37°C (Hanahan, 1983).

SOC-Medium:

SOB-Medium; 0,2 % Glucose; sterilfiltriert

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Herstellung von RIPA-Extrakten

Für die Herstellung von Zellextrakten wurden die Zellen für 5 min bei 400 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um restliches Medium zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand möglichst komplett abgenommen und die Zellen in RIPA-Puffer resuspendiert, dem unmittelbar vor Verwendung 1/25 Vol eines „Protease Inhibitor Cocktails“ (Roche) zugesetzt worden war. Dabei wurden je 1×10^6 LCL in 10 µl RIPA-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert und danach für 15 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Proteine wurden im Überstand geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

RIPA-Puffer:

1% NP40; 0,5% DOC (Deoxycholat); 0,15 M NaCl; 5 mM EDTA; 50 mM Tris pH 8.0; 0,1% SDS in H₂O

5.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) nach Laemmli (1990). Die Acrylamidkonzentration der Polyacrylamidgele betrug im Sammelgel 4 % und im Trenngel 10% oder 14%. Die Proben wurden 1:1 mit SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. Als Proteinstandard wurde „Page Ruler Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Gelkammer bei konstant 120 V für 1-2 h oder bei konstant 20 V üN. Durch die Western-Blot-Analyse oder eine Coomassie-Färbung konnten Proteine anschließend sichtbar gemacht werden.

Sammelgel:

2 ml 30 % PAA; 7,5 ml 2 x Tris/SDS pH 6.8; 5,4 ml H₂O; 90 µl 10 % APS; 10 µl TEMED

2 x Tris/SDS pH 6,8:

7,56 g Tris-Base; 2,5 ml 20 % SDS pH 6.8; H₂O ad 250 ml

Trenngel (10,5%):

7 ml 30 % PAA; 10 ml 2 x Tris/SDS pH 8.8; 2,8 ml H₂O; 167 µl 10 % APS; 17 µl TEMED

Trenngel (14%):

9,3 ml 30 % PAA; 10 ml 2 x Tris/SDS pH 8.8; 0,5 ml H₂O; 167 µl 10 % APS; 17 µl TEMED

2 x Tris/SDS pH 8,8:

22,68 g Tris-Base; 2,5 ml 20 % SDS; pH 8.8; H₂O ad 250 ml

Laufpuffer:

0,025 M Tris-Base; 0,2 M Glycin; 0,1 % SDS in H₂O

SDS-PAGE-Ladepuffer:

200 mM Tris/HCl pH 6.8; 8 % SDS; 40 % Glycerin; 400 mM DTT; 0,2 mM EDTA/NaOH pH 8,0; 0,4 % Bromphenolblau in H₂O

5.3.3 Coomassie-Färbung

Coomassie-Brillant-Blau ist ein Farbstoff, der an basische Seitenketten der Aminosäuren bindet und somit Proteine unspezifisch anfärbt. Nach dem Auftrennen der Proteine wurde das Polyacrylamidgel für 15 min in Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel in Färbelösung (PageBlue Protein Staining Solution, Fermentas) gegeben und üN unter Schwenken inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung entfernt und das Gel durch Zugabe von Wasser entfärbt, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht war. Dann wurde das Wasser abgegossen und das Gel für 15 min mit Entfärbelösung unter Schwenken inkubiert. Danach wurde das Gel getrocknet. Dazu wurde das Gel zwischen zwei Folien (Gel Drying Film, Promega), die für 2 min in Entfärbelösung eingelegt worden waren, eingebettet und in einen Rahmen üN zum Trocknen gespannt.

Entfärbelösung:

40 % MeOH; 10 % Glycerin; 7,5 % Essigsäure in H₂O

5.3.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen

5.3.4.1 Protein-Transfer (Western-Blot)

Um die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine spezifisch detektieren zu können, wurden diese elektrophoretisch auf eine Trägermembran übertragen. Der Elektrotransfer der Proteine aus SDS-Gelen auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) Membran (Hybond-P, GE Healthcare) erfolgte mit Hilfe einer „Hoefer“-Naßblotanlage (Warwickshire, UK). Dafür wurde nach Angaben des Herstellers ein Transferpuffer verwendet. Der

Transfer der Proteine wurde bei einer Stromstärke von 300 mA für 1-2 h bei 4°C durchgeführt.

Transfer-Puffer:

21 g Glycin; 4,5 g Tris; 300 ml Methanol; ad 1,5 l H₂O

5.3.4.2 Immunologischer Nachweis der transferierten Proteine

Nach dem Protein-Transfer wurde die Membran für 2 h in Block-Puffer inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit Wasch-Puffer gewaschen und bei RT für 2 h oder über Nacht bei 4°C mit der Primärantikörper-Lösung auf einem Falcon-Roller inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit Wasch-Puffer gewaschen, damit ungebundener Primärantikörper entfernt wurde. Darauf erfolgte eine Inkubation mit der Sekundärantikörper-Lösung für 1 h bei RT. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die Proteine mit Hilfe des ECL-Plus-Detektionssystems (GE Healthcare) und nachfolgender Belichtung eines Röntgenfilms (CEA Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive, Agfa HealthCare) nachgewiesen.

Block-Puffer:

5 % Magermilchpulver in PBS

Wasch-Puffer:

3 % Magermilchpulver in PBS

Primärantikörper-Lösung:

Primärantikörper in 3 % Magermilchpulver in PBS

Sekundärantikörper-Lösung:

Sekundärantikörper in 3 % Magermilchpulver in PBS

Die Primärantikörper wurden in den folgenden Verdünnungen verwendet.

Tabelle 5.5: Verdünnung der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Antikörper	Verdünnung
anti-BGLF5	1:20000	anti-BMRF1	1:1000
anti-BNLF2a	1:10	anti-His	1:40
anti-BRLF1	1:500	anti-LMP2A	1:10
anti-BZLF1	1:500	anti-Xpress	1:5000
anti-EBNA3C	1:20	anti-ZEB1	1:500

Die verwendeten HRP-gekoppelten Sekundärantikörper anti-Maus-IgG, anti-Ratte-IgG und -IgM und anti-Kaninchen-IgG wurden 1:10.000 verdünnt eingesetzt.

5.4 Zellbiologische Methoden

5.4.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle eukaryotischen Zellen wurden in einem Zellkulturinkubationsschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Zellkulturmedien wurden bei 4°C gelagert und nicht länger als drei Monate genutzt. Serum wurde bei -20°C, andere Zusätze entsprechend den Herstellerangaben gelagert. Arbeiten an den Zellen wurden in einer Sterilbank unter streng aseptischen Bedingungen ausgeführt.

5.4.1.1 Kultivierung adhärent wachsender Zelllinien

Die humane, embryonale Nierenzelllinie HEK293T wurde in großen Kulturschalen in DMEM-Komplettmedium kultiviert. Durch Abnehmen des Mediums, Zugabe von 10 ml Trypsin-EDTA und Inkubation für 5 min bei 37°C wurden die Zellen vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in einem Spitzbodenröhrchen zentrifugiert und das Pellet in DMEM-Komplettmedium aufgenommen. Danach wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 verdünnt und in eine neue Kulturschale ausgebracht. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurde dies alle 3-4 Tage wiederholt.

5.4.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen:

Die LCL, LCL Z(-) und BL-Zelllinien wurden als Suspensionskulturen in RPMI 1640-Komplettmedium gehalten. Wenn nicht anders erwähnt, wurden Suspensions-Zelllinien in Zellkulturflaschen kultiviert und je nach Bedarf alle 3 bis 4 Tage in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 (Zellsuspension zu frischem Medium) geteilt.

5.4.1.3 Kultivierung von etablierten T-Zellen

Die verwendeten T-Zellklone wurden in 24-Lochplatten in T-Zell-Medium mit 10 U/ml IL-2 und 10 µg/ml Ciprofloxacin kultiviert. Alle 14 Tage wurden die T-Zellen mit humanen *feeder*-Zellen, bestehend aus bestrahlten (40 Gray) mononukleären Zellen aus peripherem Blut (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMCs), gewonnen aus *buffy coats* von mindestens 3 verschiedenen Spendern, sowie bestrahlten (80 Gray) autolo-

gen LCL als antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) in T-Zellstimulationsmedium restimuliert. Die APC wurden 24-48 h zuvor mit dem für die jeweiligen T-Zellen spezifischem Protein (500 ng/ml) oder Viruskonzentrat, bzw. 2 h vor Restimulation mit spezifischem Peptid (2 µg/ml) beladen, um die Präsentation des gewünschten Antigens zu verstärken. Die beladenen APC wurden vor Einsatz zur T-Zellstimulation mindestens dreimal gewaschen, um Verschleppung von Protein bzw. Peptid zu vermeiden. Für die Stimulation wurden pro Loch einer 24 Lochplatte 1×10^6 T-Zellen gemeinsam mit 5×10^5 der entsprechenden LCL und 1×10^6 feeder-Zellen ausgebracht. Nach 3-4 Tagen wurde das Medium größtenteils entfernt und durch frisches T-Zellmedium mit 10 U/ml IL-2 ersetzt.

T-Zellstimulationsmedium:

T-Zellmedium; 10 U/ml IL-2; 250 ng/ml PHA; 10 µg/ml Ciprofloxacin

5.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Aus einer homogenen Zellsuspension wurden 10 µl entnommen, 1:1 mit Trypanblau vermischt und 10 µl davon in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Da Trypanblau tote Zellen anfärbt, können diese von lebenden Zellen unterschieden werden. Die Neubauer-Zählkammer besitzt 4 Bereiche mit je 16 Quadranten. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden alle Bereiche ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Gesamtzellzahl wurde dann wie folgt errechnet: Zellzahl pro Bereich $\times 2$ (Trypanblau-Verdünnung) $\times 10^4$ (Eichung der Zählkammer) \times Volumen (ml) der gesamten Zellsuspension. Vor dem Zählen durchgeführte, weitere Verdünnungen wurden ebenfalls einberechnet. Die Zellen wurden dann über Zentrifugation und Aufnahme in entsprechenden Mengen Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt.

5.4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurde zunächst die Anzahl der Zellen bestimmt. 1×10^7 Zellen wurden dann zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 1,8 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Suspension wurde nachfolgend in ein 1,8 ml-Kryoröhrchen überführt, verschlossen, mehrfach mit Zellstoff umwickelt und bei -80°C eingefroren. Nach 2–3 Tagen wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff zur dauerhaften Lagerung transferiert.

Eingefrorene Zellen wurden zügig aufgetaut und dann sofort in RPMI 1640-Medium ohne Zusätze überführt, um die Zellen von DMSO zu befreien. Nach Zentrifugation

wurde das Pellet in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und in Zellkulturschalen oder -flaschen ausgebracht. T-Zellen wurden direkt nach dem Auftauen restimuliert.

Einfriermedium:

90 % FCS; 10 % DMSO

5.4.4 Isolation von peripheren mononuklearen Zellen aus Vollblut durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Zunächst wurde von Spendern venöses Blut entnommen und die Koagulation durch EDTA- (Endkonzentration 1,5 mM) oder Natrium-Heparinzugabe verhindert. Die Spender waren entweder gesunde, freiwillige EBV-positive oder –negative Spender. Alternativ wurden *buffy coats* als Ausgangsmaterial verwendet. Untersuchungen an humanem Material wurden nach Richtlinien der Ethikkommission der Technischen Universität München durchgeführt. Zur Isolation der PBMC wurde das Blut in einem Verhältnis von 1:1 mit Waschmedium verdünnt und je 35 ml davon in einem 50 ml-Reaktionsgefäß mit 13 bis 15 ml einer Ficoll-Lösung (Pancoll; Pan) unterschichtet. Nach einer Zentrifugation mit 750 x g für 30 min, ohne Verwendung der Zentrifugenbremse zum Abstoppen, sammelten sich die PBMC oberhalb der Ficoll-Lösung in einem Ring und konnten von den Erythrozyten und weiteren Blutbestandteilen durch Absaugen getrennt werden. Die PBMC wurden nachfolgend zweimal mit Waschmedium gewaschen (Zentrifugation mit 500 x g für zunächst 10 und dann 5 min), in RPMI 1640-Komplettmedium aufgenommen, gezählt und nach Bedarf weiterverarbeitet. Bei der Aufarbeitung der *buffy coats* wurden die PBMCs von mindestens drei verschiedenen Spendern gemischt und vor der weiteren Verwendung für 60 min mit 40 Gray bestrahlt, danach mit RPMI 1640-Medium gewaschen und in frischem Medium resuspendiert.

5.4.5 Herstellung von Viruskonzentrat

Zur Herstellung von Viruskonzentrat wurden Zellen der Krallenaffen Zelllinie B95.8 in hoher Zelldichte über mehrere Tage kultiviert. Anschließend wurde der Überstand gesammelt und in einer Amicon Ultra-15 Zentrifugal-Filter-Einheit für 15-20 min bei 1000 x g auf ein Zehntel des Ausgangsvolumen eingeeengt. Gelagert wurde das Viruskonzentrat bei -80°C.

5.4.6 Transfektion der HEK293T-Zellen mit Polyethylenimin

Für die Transfektion von 70-80% konfluenten HEK293T-Zellen wurde ein Transfektions-Mix wie unten beschrieben hergestellt. Dazu wurde das OPTIMEM mit PEI und dem zu transfizierenden Plasmid versetzt, das Gemisch für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in entsprechendem Volumen DMEM-Komplettmedium aufgenommen. Nach Entfernen des Kulturmediums wurde der Transfektions-Mix vorsichtig auf die HEK293T-Zellen gegeben, möglichst ohne Zellen vom Boden der Kulturschale abzuspülen. Nach 8 h wurde der Transfektions-Mix wieder entfernt und durch Kulturmedium ersetzt.

Tabelle 5.6: Transfektions-Mix

Zellkulturplatte	6 Loch Platte
OPTIMEM	250 µl
DNA	7,5 µg
PEI	11,25 µl
Inkubation	15 min bei RT
Medium nach Inkubation	5 ml

PEI: 1mg/ml in H₂O, pH 7,0

5.4.7 Transfektion von Suspensionszellen mittels Elektroporation

5.4.7.1 Transfektion mittels GenePulser II

Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen 1:1 geteilt, um eine logarithmische Wachstumsphase zu erreichen. Am darauffolgenden Tag wurden 1×10^7 Zellen für 5 min bei 500 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml Waschmedium resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 10 ml OPTIMEM resuspendiert und wiederum für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 300 µl OPTIMEM aufgenommen, in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm Spaltbreite) überführt, mit 20 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA versetzt und die Zellen bei 230 V und 975 µF mittels GenePulser II elektroporiert. Die Zellen wurden umgehend in 1 ml FCS aufgenommen und in eine mit 10 ml RPMI 1640-Komplettmedium vorbereitete Kulturflasche gegeben (Baum et al., 1994).

5.4.7.2 NEON-Transfektion von Suspensionszellen

Zellen in logarithmischer Wachstumsphase wurden einmal in Waschmedium und anschließend einmal in PBS gewaschen. Für die Elektroporation wurden 1×10^6 Zellen in 100 μ l Puffer R aufgenommen und mit 2 μ g der gewünschten Plasmid-DNA versetzt. In die Pipettenstation wurden 3 ml Puffer E2 gefüllt. Die Zell-DNA-Suspension wurde mit der Neon-Pipette aufgezogen und in die Station gestellt. Die Elektroporation erfolgte mit 2 Pulsen von je 30 ms bei 1100 V. Sofort nach Elektroporation wurden die Zellen in eine Vertiefung einer 24-Lochplatte mit 2 ml vorgewärmtem RPMI 1640-Komplettmedium (ohne Antibiotika) überführt. Die Zellen wurden ∞ bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und am nächsten Tag in frisches RPMI 1640-Komplettmedium (mit Antibiotika) überführt.

5.4.8 Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellseparation (*magnetic cell separation*, MACS) wurde durchgeführt, um den Anteil an transfizierten Zellen zu erhöhen. Dabei wurden 1×10^7 Zellen, die nach Zugabe von Doxzyklin den NGF-Rezeptor (*nerve growth factor receptor*, NGFR) auf ihrer Oberfläche exprimierten, durch MACS angereichert. Dazu wurden die Zellen geerntet und für 5 min bei 500 x g sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in Waschmedium resuspendiert und zentrifugiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden diese in 300 μ l Waschmedium aufgenommen, mit 100 μ l anti-NGFR-Antikörper versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10 ml MACS-Puffer zugegeben und die Zellen für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst komplett entfernt. Anschließend wurden pro 1×10^7 Zellen in 80 μ l MACS-Puffer resuspendiert, mit 20 μ l Ziege-anti-Maus-IgG MicroBeads versetzt und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Zellen in 500 μ l MACS-Puffer aufgenommen. Danach wurden die Zellen auf eine zuvor mit 4 ml MACS-Puffer äquilibrierte MACS-Säule (LS) im MACS-Ständer geladen. Die Säule wurde dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen und der Durchlauf als Negativfraktion aufgefangen. Um die positiven Zellen von der Säule zu eluieren, wurde die Säule zuerst aus dem MACS-Ständer genommen und in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Anschließend wurden zweimal je 5 ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben, wobei die zweiten 5 ml mit einem zu den Säulen passenden Pistill durchgedrückt wurden. Anschließend wurden sowohl die Positiv- als auch die Negativfraktion abzentrifugiert. Die

Zellen wurden einmal mit 10 ml RPMI 1640-Komplettmedium gewaschen und anschließend in RPMI 1640-Komplettmedium kultiviert.

MACS-Puffer:

0,5% BSA; 2 mM EDTA in PBS; sterilfiltriert

5.4.9 Durchflusszytometrie

Um bestimmte Merkmale und Eigenschaften von Zellen zu untersuchen, wurde eine FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) vorgenommen. Da die transfizierten Plasmide entweder das grünfluoreszierende Protein (GFP) oder ein GFP-Fusionsprotein exprimierten, konnte die Grünfluoreszenz der Zellen mittels FACS direkt bestimmt werden. Die Zellen wurden für 5 min bei 500 x g abzentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen, zu dem zuvor Propidiumjodid (PI) (Endkonzentration 1 µg/ml) zugefügt worden war, und im FACS analysiert. PI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA von Zellen interkaliert. Da dieser Farbstoff die Zellmembran lebender Zellen nicht penetriert, kann über die PI-Färbung der Anteil an toten Zellen mittels FACS bestimmt werden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der CellQuest Software.

FACS-Puffer:

2% FCS, 0,05 % NaN₃ in PBS

5.4.10 Enzyme-linked immunosorbent assay

Für die Bestimmung der Antigenerkennung durch T-Zellen wurden IFN γ - und/oder GM-CSF-ELISA der Firma R&D System durchgeführt. Dazu wurden 96-Loch-ELISA-Platten mit je 100 µl/Loch des entsprechenden *Capture*-AK (1:180 in PBS) beschickt und üN bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer mit je 300 µl/Loch Blockpuffer für mindestens eine Stunde bei RT geblockt. Nach erneutem dreimaligem Waschen folgte eine zweistündige Inkubation mit je 100 µl Kulturüberstand bzw. 100 µl einer titrierten Standardreihe. Anschließend wurde der Zellüberstand, bzw. der mitgeführte Standard durch dreimaliges Waschen entfernt und je 100 µl/Loch *Detection*-AK (1:180 in *Reagent diluent*) zugegeben. Nach einer erneuten zweistündigen Inkubation wurden die Platten wiederum dreimal gewaschen und anschließend mit je 100 µl/Loch Streptavidin-HRP (1:200 in *Reagent diluent*) für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen, mit 100 µl/Loch Färbelösung versetzt und die Färbereak-

tion nach 5-20 min, je nach Blaufärbung, mit je 50 µl Stopplösung abgestoppt. Die Färbung wurde umgehend bei 450 nm im ELISA-Lesegerät gemessen.

ELISA-Blockpuffer:

PBS; 1 % BSA; 5 % Sucrose; 0,05 % NaN₃

ELISA-Waschpuffer:

PBS; 0,05 % Tween-20

Reagent diluent:

PBS; 1 % BSA; sterilfiltriert

Färbelösung:

BD OptEIA Substrat Reagenz A und B (1:1 gemischt)

Stopplösung:

2N H₂SO₄

6 Ergebnisse

6.1 Induktion des lytischen Zyklus von EBV in B-Zellen durch verschiedene chemische Stimuli

Der lytische Zyklus von EBV kann *in vitro* durch verschiedene Agenzien induziert werden (Kieff and Rickinson, 2006). Dabei wirken diese chemischen Reize als Aktivatoren auf die essentiellen Transkriptionsfaktoren BZLF1 und BRLF1. Im Folgenden wurde der Einfluss von verschiedenen chemischen Stimuli auf die Induktion des lytischen Zyklus von EBV in unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Dabei wurde die Reaktivierung von EBV in Abhängigkeit von dem Phorbolester TPA und den Histondeacetylase-Inhibitoren Butyrat, VPA sowie DMSO getestet. Die Eigenschaft von TPA, Butyrat und VPA die lytische Replikation von EBV in manchen Zellen zu aktivieren, ist in der Literatur bereits beschrieben worden (zur Hausen et al., 1978, Luka et al., 1979, Jones et al., 2010). Dagegen konnten bislang keine Hinweise in der Literatur gefunden werden, dass DMSO den lytischen Zyklus von EBV induziert. Dies sollte in dieser Arbeit getestet werden, da bekannt ist, dass DMSO die Acetylierung von Histonen erhöht und dadurch womöglich die EBV-Reaktivierung beeinflussen kann. Die Induzierbarkeit des lytischen Zyklus wurde in verschiedenen LCL und EBV-positiven BL-Zelllinien untersucht. Als Negativkontrolle diente die EBV-positive Raji-Zelllinie, in der EBV aufgrund einer genetischen Deletion nicht den kompletten lytischen Zyklus durchlaufen kann (Kieff and Rickinson, 2006). Um die Induktion des lytischen Zyklus nachzuweisen, wurden T-Zellerkennungsversuche mit Hilfe von EBV-spezifischen T-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die LCL bzw. BL-Zelllinien mit TPA (20 ng/ml), DMSO (1%), Butyrat (3 mM oder 1,5 mM) oder VPA (100, 30 und 10 ng/ml) für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und für weitere 72 h kultiviert. Um eine Erkennung von lytisch infizierten Zellen durch EBV-spezifische T-Zellen zu analysieren, wurden die unbehandelten und behandelten Zelllinien mit dem CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 kokultiviert, der ein Epitop des späten lytischen Strukturproteins BLLF1 auf HLA DRB1*1301 erkennt. Da nicht alle getesteten B-Zellen HLA DRB1*1301 exprimierten, wurden die unbehandelten und behandelten Zelllinien 24 h vor Zugabe der T-Zellen mit den BZLF1-k.o. LCL JM (LCL Z(-) JM) kokultiviert. Diese LCL exprimieren das restringierende HLA-Allel und können daher das BLLF1-Epitop auf der Zelloberfläche präsentieren, können aber aufgrund der Deletion des BZLF1-Gens selber nicht lytisch reaktivieren. Sollten nach Behandlung der Zellen der lytische Zyklus von EBV induziert und neue Virionen freigesetzt werden, könnten diese durch CD21-Rezeptor-

vermittelte Endozytose von den LCL Z(-) JM aufgenommen und Viron-Antigene über den klassischen MHC-II-Präsentationsweg auf HLA DRB1*1301-Molekülen präsentiert werden. Eine mögliche Erkennung durch den BLLF1-spezifischen T-Zellklon und die damit verbundene Zytokinausschüttung wurde im IFN γ -ELISA gemessen.

Wie in Abbildung 6.1 dargestellt, zeigten die verschiedenen EBV-infizierten Zellen eine unterschiedliche Reaktion auf die Behandlung mit den verschiedenen chemischen Stimuli. Die Mischkultur aus der Zelllinie B95.8 und LCL Z(-) JM wurde von dem T-Zellklon BLLF1-1D6 im unbehandelten sowie im behandelten Zustand sehr gut erkannt. Dies wies auf eine allgemein sehr hohe lytische Replikation von EBV in der B95.8-Zelllinie hin, die durch Behandlung mit den unterschiedlichen chemischen Stimuli nicht weiter gesteigert werden konnte. Die EBV-positive BL-Zelllinie KEM wies ebenfalls eine relativ hohe lytische Aktivität auf. Allerdings wurde, im Gegensatz zu B95.8, eine Erhöhung der lytischen Replikation von EBV durch Induktion mit TPA und Butyrat festgestellt. Die Zugabe von VPA schien dagegen die Induktion des lytischen Zyklus zu hemmen oder toxisch auf die APC zu wirken, da im Vergleich zu unbehandelten Zellen weniger Zytokin von den T-Zellen ausgeschüttet wurde. Wie erwartet, erkannten die BLLF1-spezifischen T-Zellen nicht ihr Antigen in der Mischkultur aus der Raji-Zelllinie und LCL Z(-) JM, da es in Raji-Zellen zu keiner Produktion und Freisetzung intakter Virionen kommen kann, auch nicht nach Zugabe der chemischen Stimuli. Die drei Zelllinien LCL JM, LCL GB Ag und LCL GB exprimieren das HLA DRB1*1301 auf ihrer Zelloberfläche und konnten daher direkt im Antigenerkennungs-Versuch eingesetzt werden. Im unbehandelten Zustand wurde keine der Zelllinien von den BLLF1-spezifischen T-Zellen erkannt, demnach replizierte EBV nicht oder kaum in diesen Zellen. Allerdings konnte der lytische Zyklus von EBV in diesen LCL durch Zugabe von TPA erfolgreich induziert werden. Nach TPA-Behandlung stiegen die gemessenen IFN γ -Mengen um das 50 bis 200-fache. Dagegen führte die Behandlung der Linien mit DMSO, Butyrat und VPA zu keiner verbesserten T-Zellerkennung.

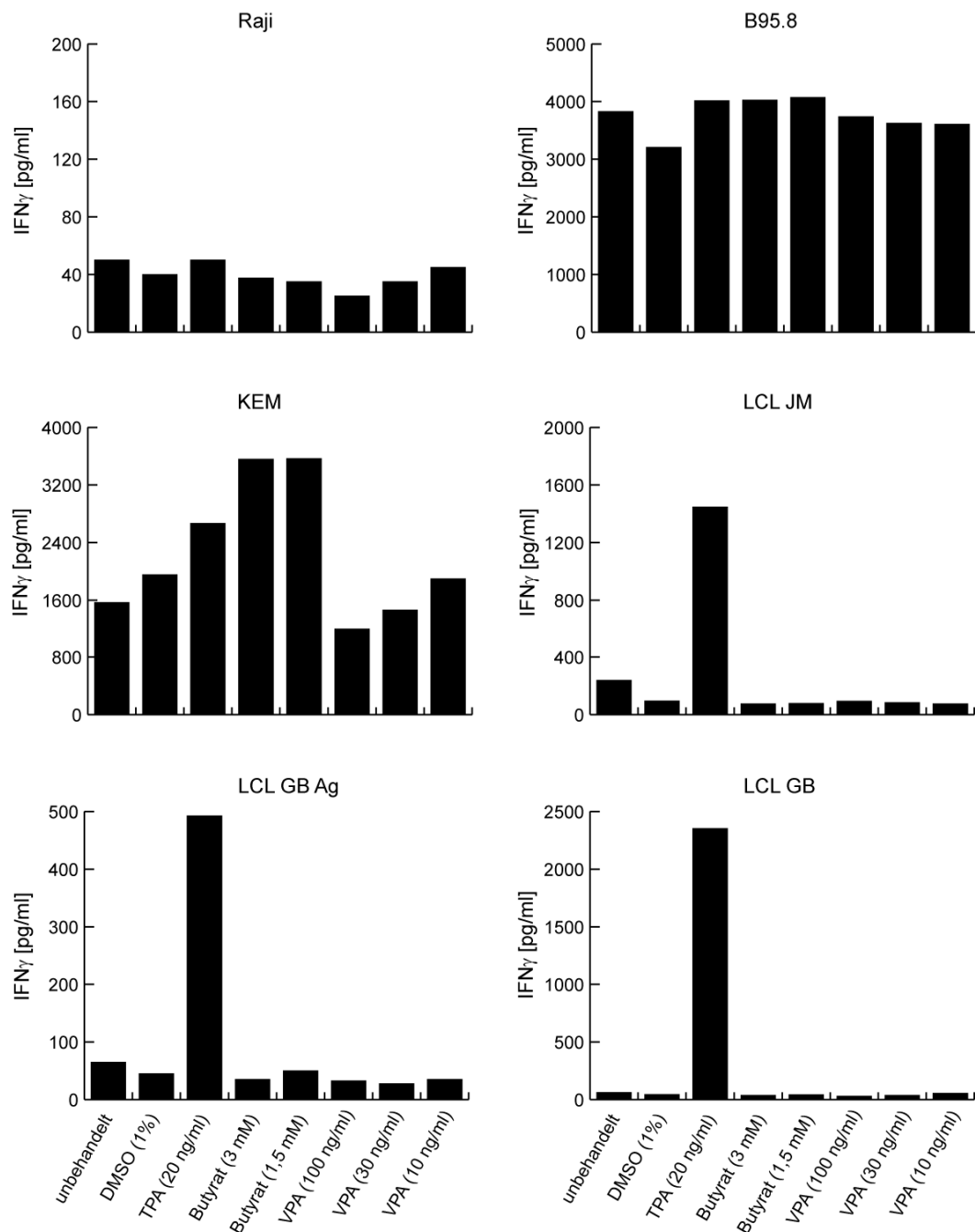


Abbildung 6.1: Induktion des lytischen Zyklus von EBV in LCL und EBV-positiven Burkitt-Lymphomzelllinien. Die BL-Zelllinien Raji und KEM, die aus Krallenaffen stammende EBV-Produzenten-Zelllinie B95.8 sowie verschiedene LCL (LCL JM, LCL GB Ag und LCL GB) wurden in An- oder Abwesenheit von DMSO (1 %), TPA (20 ng/ml), Butyrat (3 mM bzw. 1,5 mM) und VPA (100, 30 und 10 ng/ml) für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und nach weiteren 72 h die Virusproduktion durch Kokultur mit dem BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 abgefragt. Die dabei freigesetzten Mengen an IFN- γ wurden mittels ELISA bestimmt. Da nicht alle Zelllinien das T-Zellrestriktionselement HLA DRB1*1301 exprimierten, wurde 24 h vor T-Zellzugabe die HLA DRB1*1301-positive LCL Z(-) JM zugesetzt. Ähnliche Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Ergebnissen erhalten. Abkürzungen: DMSO, Dimethylsulfoxid; TPA, 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat; VPA, Valproinsäure

6.2 Kinetik der EBV-spezifischen T-Zellerkennung von LCL nach Induktion des lytischen Zyklus mittels 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat

Aufgrund der guten Reaktivierung von EBV in den LCL JM und LCL GB durch TPA wurde in diesen Zelllinien die zeitabhängige T-Zellerkennung von lytisch infizierten B-Zellen näher untersucht. Dazu wurden LCL JM und LCL GB mit 20 ng/ml TPA für 24 h behandelt, gewaschen, die LCL für weitere 24, 48 bzw. 72 h kultiviert, anschließend mit verschiedenen EBV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kokultiviert und die Zytokinausschüttung der T-Zellen mittels IFN γ - bzw. GM-CSF-ELISA gemessen. Wie in Abbildung 6.2 exemplarisch gezeigt, kam es bereits 48 h nach TPA-Behandlung der LCL JM zu einer Erkennung des sehr frühen Antigens BZLF1 durch den CD8⁺ T-Zellklon GB-F7, die im weiteren Verlauf wieder abnahm. Dagegen nahm die Erkennung der TPA-behandelten LCL durch CD4⁺ T-Zellen mit Spezifität für die späten lytischen Antigene BLLF1 (BLLF1-1D6) und BNRF1 (JM-BNRF1-1H7) über den gesamten Beobachtungszeitraum stetig zu. Auch die LCL GB wurden bereits 48 h nach TPA-Behandlung von dem BZLF1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon GB-F7 sowie den BNRF1- und BcLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen BLLF1-1D6 und IM1-1G12 erkannt.

Die abnehmende T-Zellerkennung von BZLF1 war vermutlich auf die verminderte Expression des Proteins nach Auswaschen von TPA zurückzuführen. Dagegen wies die zum Teil über den gesamten Beobachtungszeitraum ansteigende CD4⁺ T-Zellerkennung später lytischer Strukturantigene auf eine weiter anhaltende Virusproduktion auch nach Entfernung von TPA hin.

Trotz der erfolgreichen Induktion des lytischen Zyklus in allen untersuchten LCL war eine detaillierte Untersuchung der T-Zellerkennung lytisch reaktiver Zellen nicht möglich, da TPA einerseits viele zelluläre Prozesse beeinflusst und so unspezifische Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden konnten und TPA andererseits zu einer unspezifischen Aktivierung der T-Zellen führt, so dass keine Untersuchung der T-Zellerkennung während der TPA-Behandlung möglich war. Diese Experimente wiesen jedoch darauf hin, dass eine Reaktivierung von EBV in diesen Zellen prinzipiell möglich war. Deshalb sollte eine mögliche Induktion des lytischen Zyklus von EBV durch die konditionale Expression von BZLF1 in diesen Zellen untersucht werden.

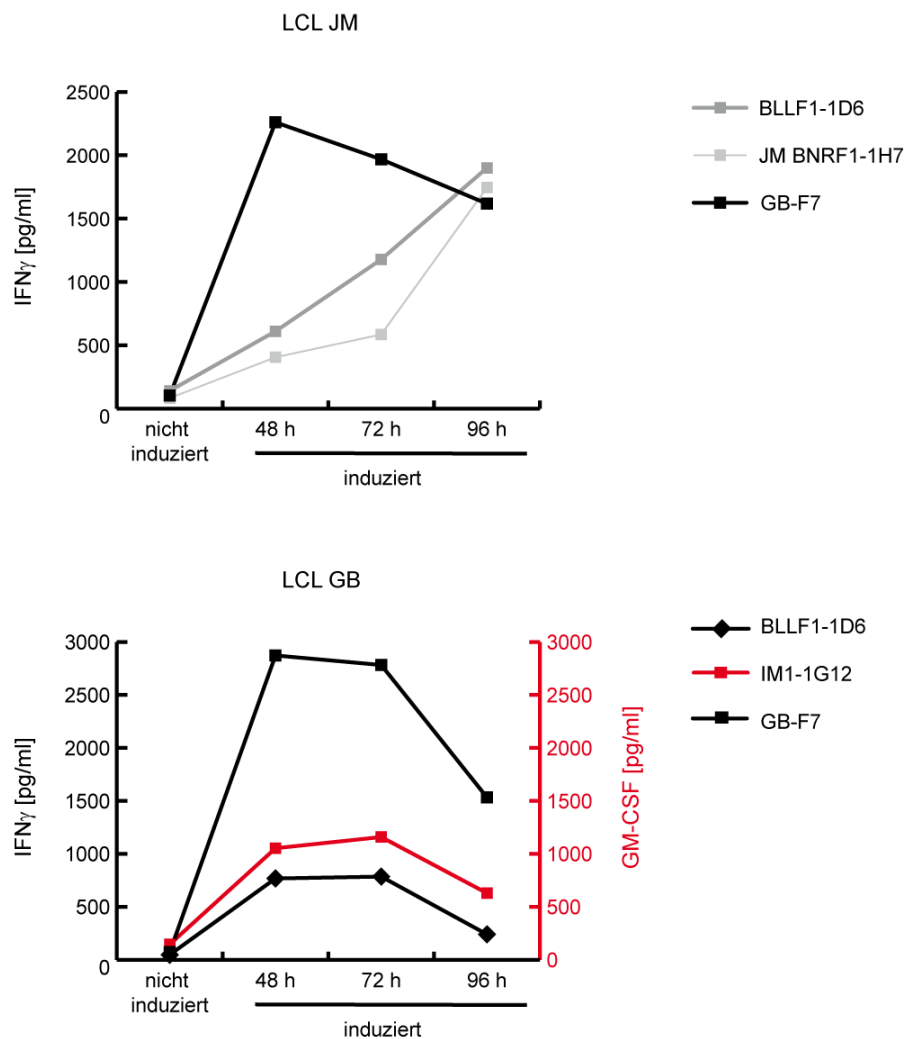


Abbildung 6.2: Kinetik der EBV-spezifischen T-Zellerkennung von LCL JM und LCL GB nach Induktion des lytischen Zyklus durch TPA. LCL JM und LCL GB wurden mit 20 ng/ml TPA für 24 h behandelt. Anschließend wurde TPA durch mehrmaliges Waschen entfernt und die Zellen für weitere 24, 48 bzw. 72 h in Abwesenheit von TPA kultiviert. Eine mögliche Erkennung der LCL durch EBV-spezifische $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen wurde in Zytokinfreisetzungsexperimenten bestimmt. Die freigesetzten Mengen an $IFN\gamma$ bzw. GM-CSF wurden mittels ELISA ermittelt. **a)** Die Erkennung von LCL JM zu verschiedenen Zeitpunkten nach TPA-Behandlung wurde mit dem BLLF1-spezifischen $CD4^+$ T-Zellklon BLLF1-1D6, dem BNRF1-spezifischen $CD4^+$ T-Zellklon JM BNRF1-1H7 und dem BZLF1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellklon GB-F7 untersucht. **b)** Die Erkennung von LCL GB zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion wurde mit dem BLLF1-spezifischen $CD4^+$ T-Zellklon BLLF1-1D6, dem BcLF1-spezifischen $CD4^+$ T-Zellklon IM1-1G12 und dem BZLF1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellklon GB-F7 analysiert. Als Negativkontrolle dienten TPA-unbehandelte LCL. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis.

6.3 Induktion des lytischen Zyklus von EBV in lymphoblastoiden Zelllinien mittels konditionaler BZLF1-Expression

6.3.1 Etablierung eines konditionalen BZLF1-Expressionssystems in LCL

Um zu untersuchen, ob in LCL der lytische Zyklus von EBV durch die Expression von BZLF1 induziert werden kann, wurden ausgehend vom Vektor pRTS-1 (Bornkamm et al., 2005), drei verschiedene BZLF1-Expressionsplasmide erstellt und getestet. Der Vektor pRTS-1 trägt einen bidirektionalen, Tetrazyklin-induzierbaren Promotor, was die gleichzeitige Expression eines Zielgens und eines Reportergens, hier das GFP, erlaubt. Der Promotor basiert auf dem sogenannten *Tet-On*-System, welches die Transkription der Zielgene in Anwesenheit von Tetrazyklin oder des Tetrazyklin-Derivats Doxyzyklin ermöglicht (Gossen et al., 1995). Zudem enthält dieser Vektor den plasmidalen Replikationsursprung von EBV (oriP) sowie das *EBNA1*-Gen, wodurch eine episomale Replikation des Plasmids nach stabiler Transfektion in humanen Zellen gewährleistet wird (Abbildung 6.3).

Die Expression von BZLF1 im Plasmid Tet-Ery-BZLF1-IRES-NGFR-IV wird allein durch Zugabe von Doxyzyklin induziert (Abbildung 6.3a). Zusätzlich werden die extrazelluläre Domäne des Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (NGFR) sowie das Reportergen GFP exprimiert, wobei *BZLF1* und *NGFR* durch eine interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*, IRES) voneinander getrennt sind.

In dem Expressionsplasmid BZLF1-TxER-Tet-NGFR-GFP ist das *BZLF1*-Gen mit der mutierten Hormonbindedomäne des Östrogen-Rezeptors fusioniert, die noch Tamoxifen, aber nicht mehr Östrogen bindet (Abbildung 6.3b). Das daraus resultierende Fusionsprotein wird in Abwesenheit von Tamoxifen im Zytoplasma zurückgehalten und ist funktionell inaktiv. Für die Expression eines funktionellen BZLF1 ist somit die Zugabe von Doxyzyklin und Tamoxifen notwendig.

Das dritte BZLF1-Expressionsplasmid Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1 ermöglicht die Expression von BZLF1 in Abhängigkeit von Doxyzyklin und Erythromycin (Abbildung 6.3c). Durch diesen, auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Fussenegger (Weber et al., 2002) basierenden, in der Arbeitsgruppe entwickelten Promotor kann die Expression von NGFR unabhängig von BZLF1 erfolgen. Ähnlich wie nach Transfektion mit dem BZLF1-TxER-Tet-NGFR-GFP-Plasmid können dadurch transfizierte Zellen über magnetische Zellsortierung angereichert werden, ohne dass die Expression von BZLF1

induziert wird. Dadurch sollte vermieden werden, dass eine mögliche Induktion des lytischen Zyklus zum Verlust der transfizierten Zellen führte.

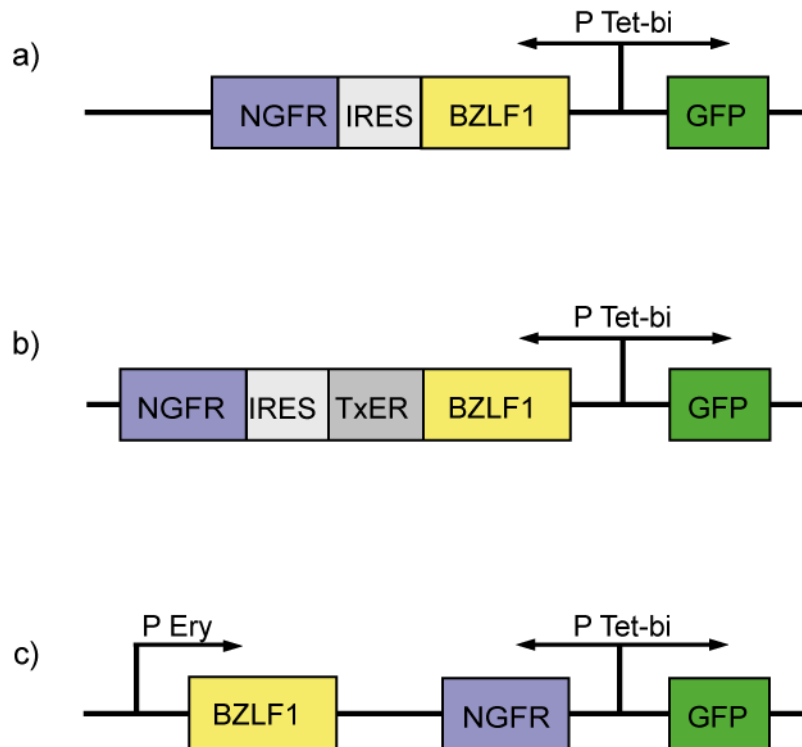


Abbildung 6.3: Schematische Darstellung der verwendeten BZLF1-Expressionsplasmide.

a) Tet-Ery-BZLF1-IRES-NGFR-IV; **b)** BZLF1-TxER-Tet-NGFR-GFP; **c)** Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1. Abkürzungen: P Tet-bi, bidirektionaler Tetrazyklin-regulierbarer Promotor; P Ery, Erythromycin-regulierbarer Promotor; IRES, interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*); NGFR, Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (*nerve growth factor receptor*); TxER, mutierte Hormonbindedomäne des Östrogen-Rezeptors; GFP, grünfluoreszierendes Protein.

Die verschiedenen Vektoren wurden mittels Elektroporation in LCL GB-Zellen stabil eingebracht und nach Doxyzyklinzugabe der Anteil an transfizierten Zellen durch einmalige oder wiederholte magnetische Zellsortierung angereichert. Dadurch wurden folgende stabil transfizierte Zelllinien generiert (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1: Beschreibung der stabil transfizierte Zelllinien. Abkürzungen: P-Tet, Tetrazyklin-regulierbarer Promotor; P-Ery, Erythromycin-regulierbarer Promotor

Zelllinie	Expressionsplasmid	Beschreibung
LCL GB/Tet-BZLF1	Tet-Ery-BZLF1-IRES-NGFR-IV	BZLF1 unter P-Tet
LCL GB/Tet-BZLF1-TxER	BZLF1-TxER-Tet-NGFR-GFP	BZLF1-Östrogenrezeptor-Fusionsgen unter P-Tet
LCL GB/Ery-BZLF1	Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	BZLF1 unter P-Ery

6.3.2 Induktion des lytischen Zyklus durch die Expression von BZLF1

Da alle BZLF1-Expressionsplasmide nach Zugabe von Doxyzyklin GFP exprimierten, konnte durch die Messung der Grünfluoreszenz der Anteil an transfizierten Zellen innerhalb der etablierten Zelllinien bestimmt werden (Abbildung 6.4b). Um die induzierbare Expression von BZLF1 auf Proteinebene zu überprüfen, wurden die Zelllinien für 36 h mit steigenden Mengen an Doxyzyklin behandelt und die BZLF1-Proteinmengen mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente dabei das *housekeeping* Gen *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase* (GAPDH). Wie in Abbildung 6.4c zu sehen, nahm die BZLF1-Proteinmenge in der LCL GB/Tet-BZLF1 doxyzyklinabhängig zu. Um nach Induktion der BZLF1-Expression eine mögliche Reaktivierung von EBV und die damit verbundene Expression von lytischen Antigenen zu überprüfen, wurden die Zellen für 96 h mit steigenden Mengen an Doxyzyklin induziert und danach mit dem BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 für 16 h kokultiviert. Wie in Abbildung 6.4d dargestellt, stieg die IFN γ -Ausschüttung der T-Zellen mit steigenden Doxyzyklinsmengen an. Somit konnte durch die Expression von BZLF1 in dieser Zelllinie der lytische Zyklus von EBV induziert werden.

Erfahrungsgemäß kann die Reaktivität von T-Zellen je nach T-Zellstimulation schwanken und daher können in einzelnen T-Zellexperimenten trotz gleicher Versuchsdurchführung, aber nach verschiedenen T-Zellstimulationen, größere Unterschiede bei der Zytokinausschüttung auftreten. Daher ist in allen nachfolgenden T-Zellexperimenten nur jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen durchgeführten Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen dargestellt.

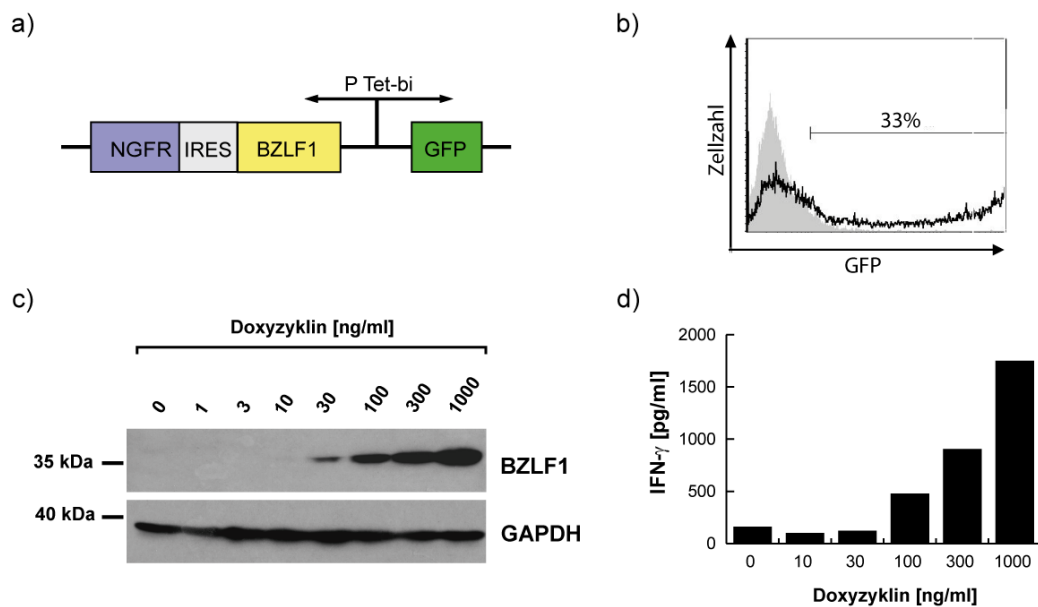


Abbildung 6.4: Induktion des lytischen Zyklus in LCL GB/Tet-BZLF1 in Abhängigkeit von Doxyzyklin: **a)** Zellen der Linie LCL GB wurden stabil mit dem Tetrazyklin-regulierbaren Plasmid Tet-Ery-BZLF1-IRES-NGFR-IV transfiziert, das die doxyzyklinabhängige Anschaltung von BZLF1 erlaubt. **b)** Mittels FACS-Analyse wurde der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen in der transfizierten Zelllinie 24 h nach Doxyzyklinzugabe (1000 ng/ml) bestimmt. **c)** Zum Nachweis des BZLF1 Proteins wurden Zelllysate elektrophoretisch aufgetrennt und durch Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper untersucht. Die Detektion von GAPDH diente zur Überprüfung der geladenen Proteinmengen. **d)** Nach Behandlung mit steigenden Mengen an Doxyzyklin für 96 h wurde die Erkennung der LCL GB/Tet-BZLF1 Transfektante durch BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im IFN γ -ELISA gemessen. Abkürzungen: P Tet-bi, bidirektionaler Tetrazyklin-regulierbarer Promotor; IRES, interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*); NGFR, Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (*nerve growth factor receptor*); GFP, grünfluoreszierendes Protein; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

Durch die Fusion mit der mutierten Hormonbindedomäne des Östrogen-Rezeptors ist die Expression eines funktionellen BZLF1-Proteins in der LCL GB/Tet-BZLF1-TxER Zelllinie nicht nur von Doxyzyklin, sondern auch von Tamoxifen abhängig (Abbildung 6.5a). Trotz eines hohen Anteils an GFP-positiven Zellen (67%) (Abbildung 6.5b) und einer doxyzyklinabhängigen Expression des Fusionsproteins (Abbildung 6.5c), erfolgte keine Erkennung durch die BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 6.5d). Dies deutete darauf hin, dass der lytische Zyklus von EBV in dieser Zelllinie nicht induziert wurde.

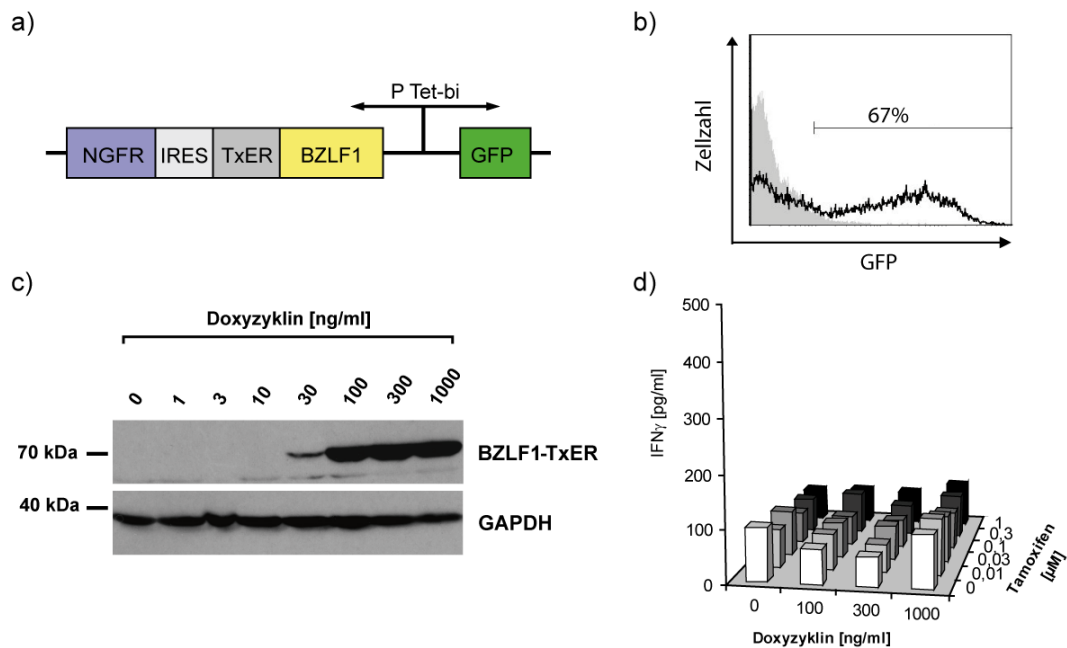


Abbildung 6.5: Induktion des lytischen Zyklus in LCL GB/Tet-BZLF1-TxER in Abhängigkeit von Doxyzyklin und Tamoxifen. **a)** Zellen der Linie LCL GB wurden stabil mit dem Tetrazyklin-regulierbaren Expressionsplasmid BZLF1-TxER-Tet-NGFR-GFP transfiziert, das für ein Tamoxifen-regulierbares BZLF1-TxER-Fusionsprotein kodiert. **b)** Der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen in der etablierten Zelllinie wurde 24 h nach Doxyzyklinzugabe (1000 ng/ml) mittels FACS-Analyse bestimmt. **c)** Die Expression des Fusionsproteins BZLF1-TxER in Abhängigkeit von der Doxyzyklinkonzentration wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Das Protein GAPDH diente als Ladekontrolle. **d)** Nach Induktion mit Doxyzyklin und Tamoxifen für 96 h wurden LCL GB/Tet-BZLF1-TxER mit dem BZLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BZLF1-1D6 für 16 h kokultiviert. Die Induktion der lytischen Replikation und die damit verbundene Produktion des späten lytischen Antigens BZLF1 wurden im IFN γ -ELISA überprüft. Abkürzungen: P Tet-bi, bidirektionaler Tetrazyklin-regulierbarer Promotor; IRES, interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*); TxER, mutierte Hormonbindedomäne des Östrogen-Rezeptors; NGFR, Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (*nerve growth factor receptor*); GFP, grünfluoreszierendes Protein; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

Um eine getrennte Expression von NGFR und BZLF1 zu ermöglichen, wurden LCL GB stabil mit dem Plasmid Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1 transfiziert (Abbildung 6.6a). Der Prozentsatz an transfizierten Zellen wurde wiederum durch Quantifizierung der grünfluoreszierenden Zellen mittels FACS analysiert und die Expression von BZLF1 in Abhängigkeit von Doxyzyklin und Erythromycin auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analyse überprüft (Abbildung 6.6b, c). BZLF1 wurde nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Doxyzyklin und Erythromycin exprimiert, und die Expression erfolgte konzentrationsabhängig. Nach Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Doxyzyklin und Erythromycin für 96 h erfolgte eine konzentrationsabhängige T-Zell-

erkennung in Anwesenheit beider Antibiotika. Somit konnte auch in dieser Zelllinie der lytische Zyklus durch die Expression von BZLF1 induziert werden (Abbildung 6.6d).

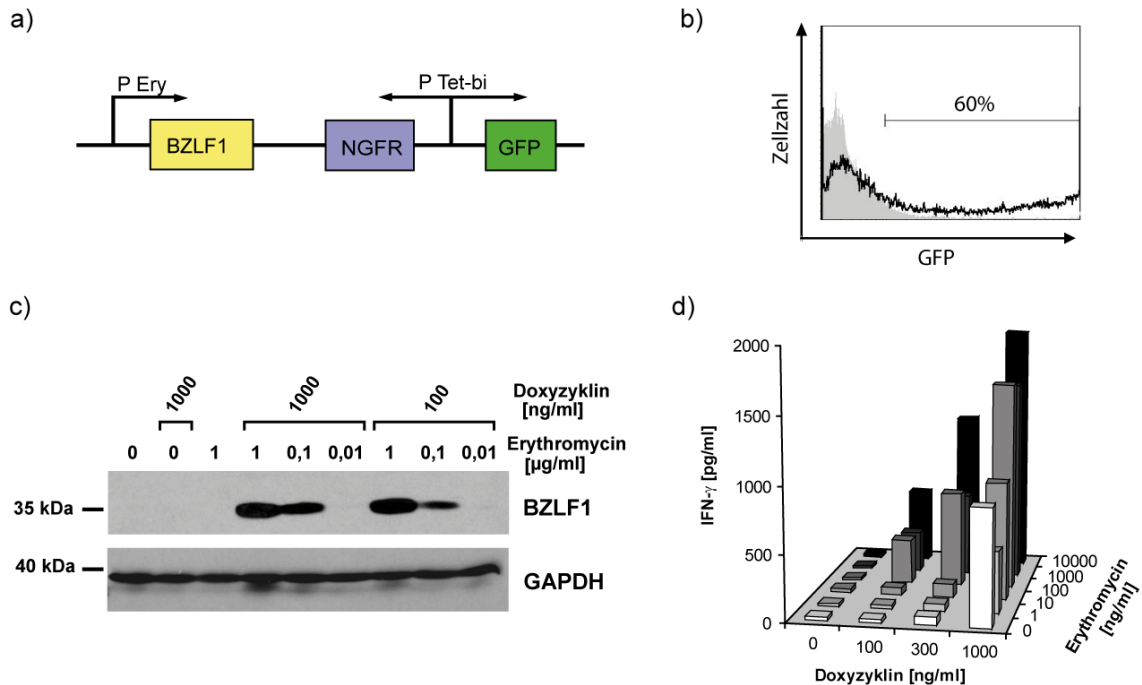


Abbildung 6.6: Induktion des lytischen Zyklus LCL GB/Ery-BZLF1 in Abhängigkeit von Doxyzyklin und Erythromycin. **a)** Zellen der Linie LCL GB wurden stabil mit dem Plasmid Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1 transfiziert, in dem die Expression von BZLF1 durch Doxyzyklin und Erythromycin kontrolliert wird. **b)** Der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen in der transfizierten Zelllinie wurde 24 h nach Doxyzyklinzugabe (1000 ng/ml) mittels FACS-Analyse bestimmt. **c)** Die BZLF1-Expression in Abhängigkeit verschiedener Doxyzyklin- und Erythromycinmengen wurde mittels Western-Blot-Analyse analysiert. **d)** Nach Induktion mit den angegebenen Konzentrationen an Doxyzyklin und Erythromycin für 96 h wurden LCL GB/Ery-BZLF1 mit dem BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen BLLF1-1D6 für 16 h kokultiviert. Die Induktion des lytischen Zyklus durch die Expression von BZLF1 wurde anhand der T-Zellerkennung im IFN γ -ELISA gemessen. Abkürzungen: P Tet-bi, bidirektionaler Tetrazyklin-regulierbarer Promotor; P Ery, Erythromycin-regulierbarer Promotor; IRES, interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*); NGFR, Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (*nerve growth factor receptor*); GFP, grünfluoreszierendes Protein; GAPDH, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase.

6.4 Untersuchung der sequentiellen Expression lytischer Proteine nach Induktion von BZLF1 in LCL

Um die zeitliche Abfolge der lytischen Genexpression im konditionalen Zellsystem zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen von LCL GB/Tet-BZLF1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Doxyzyklin-Behandlung durchgeführt. Wie in Abbildung 6.7 zu sehen, wurde BZLF1 erstmals nach 8 h detektiert, erreichte 12 h das Expressionsmaximum und nahm im weiteren Verlauf wieder ab. Das zweite, sehr frühe Antigen BRLF1 konnte ebenfalls 8 h nach Induktion detektiert werden, die Proteinmenge stieg bis 24 h nach Induktion an und nahm danach wieder ab. Die Polypeptidketten des BMRF1, auch bekannt als das diffuse frühe Antigen (*early antigen diffuse*, EaD) waren dagegen erst ab 12 h nach Induktion nachweisbar, erreichten 24 h nach Induktion ihr Maximum und nahmen dann wieder ab. Hiermit konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von Doxyzyklin die Expression von BZLF1 angeschaltet und durch BZLF1 die kaskadenartigen Expression weiterer lytischer EBV-Proteine induziert wurde.

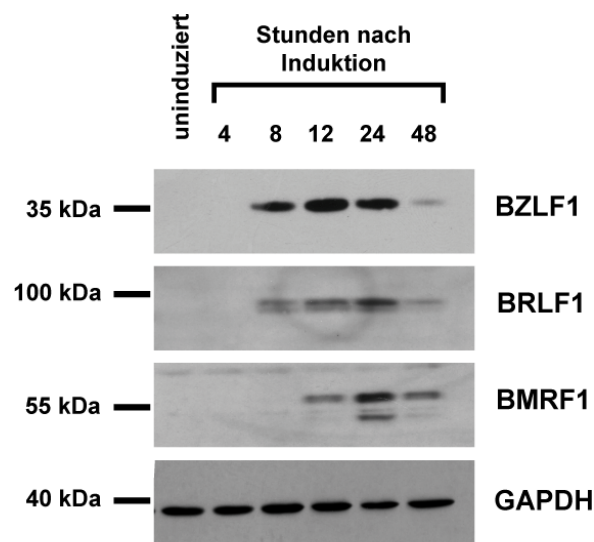


Abbildung 6.7: Expression sehr früher und früher Antigene nach Induktion des lytischen Zyklus von EBV in LCL GB/Tet-BZLF1. LCL GB/Tet-BZLF1 wurden mit 1000 ng/ml versetzt und nach 4, 8, 12, 24 und 48 h Zelllysate hergestellt. Diese wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Die zeitabhängige Expression der lytischen Proteine BZLF1, BRLF1 und BMRF1 wurde mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper und HRP-konjugierter Sekundärantikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente das Protein GAPDH. Abkürzung: HRP, *horseradish peroxidase*.

6.5 Analyse der MHC-Klasse-II-restringierten Erkennung von lytisch EBV-infizierten B-Zellen *in vitro*

Mit Hilfe der induzierbaren Zelllinie LCL GB/Tet-BZLF1 wurde geprüft, in welchem Stadium lytisch infizierte B-Zellen von EBV-spezifischen T-Zellen erkannt werden und ob die Erkennung auf der Präsentation endogener oder exogener Antigene beruhte. Um die zeitliche Abfolge der EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort genauer zu definieren, wurde zunächst der Zeitpunkt der Virusfreisetzung aus EBV-infizierten Zellen nach Induktion des lytischen Zyklus bestimmt.

6.5.1 Bestimmung des Zeitpunktes der Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln nach Induktion des lytischen Zyklus in LCL

Um zu bestimmen, ob und zu welchem Zeitpunkt nach Induktion der BZLF1-Expression infektiöse Viren aus lytisch EBV-infizierten Zellen freigesetzt werden, wurden von LCL GB/Tet-BZLF1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Doxyzyklinzugabe (1000 ng/ml) Zellüberstände gesammelt und über Amicon-Säulen mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa 10-fach konzentriert. Anschließend wurden 5 x 10⁴ LCL Z(-) JM in 150 µl Medium mit 50 µl der aufkonzentrierten Überstände für 24 h inkubiert. Der Nachweis von Viruspartikeln erfolgte durch Kokultur mit drei Strukturantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen und anschließend IFN γ - bzw. GM-CSF-ELISA. Dazu wurden die zwei BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklone BLLF1-1D6 und BLLF1-1H2, die verschiedene Epitope von BLLF1 erkennen, sowie der BNRF1-spezifische CD4⁺ T-Zellklon JM BNRF1-1H7 verwendet. LCL Z(-) JM, die mit Überständen von nicht induzierten, bzw. 12 h oder 24 h induzierten LCL GB/Tet-BZLF1 beladenen worden waren, wurden nicht von den T-Zellklonen erkannt (Abbildung 6.8). Dagegen wurden die Zielzellen, die mit Überständen von ≥ 36 h induzierten Zellen beladen worden waren, zunehmend von allen drei T-Zellklonen erkannt. Dies deutete darauf hin, dass es im Zeitraum zwischen 24-36 h nach Induktion der BZLF1-Expression zur Freisetzung von neusynthetisierten EBV-Nachkommen kam. Mit längerer Induktion der BZLF1-Expression stieg die Menge an freigesetzten Virionen an, was in einer zunehmenden Zytokinausschüttung der EBV-spezifischen T-Zellen resultierte.

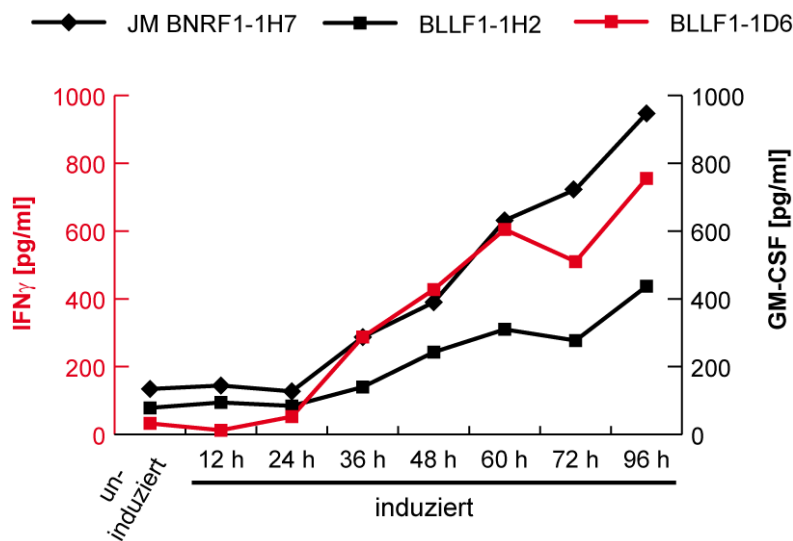


Abbildung 6.8: Bestimmung des Zeitpunktes der Virusfreisetzung aus LCL GB/Tet-BZLF1.

Die BZLF1-Expression in LCL GB/Tet-BZLF1 wurde durch Zugabe von 1000 ng/ml Doxyzyklin induziert. Kulturüberstand der induzierten Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion gesammelt, 10-fach konzentriert und für 24 h auf LCL Z(-) JM geladen. Nach anschließender Kokultur mit verschiedenen EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (JM BNRF1-1H7, BLLF1-1H2 und BLLF1-1D6) wurden die freigesetzten IFN γ - bzw. GM-CSF-Mengen mittels ELISA gemessen.

6.5.2 Bestimmung der EBV-spezifischen T-Zellerkennung von LCL zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des lytischen Zyklus

Um die MHC-II-restringierte Erkennung während der lytischen Replikation näher zu analysieren, wurde die Zelllinie LCL GB/Tet-BZLF1 mit unterschiedlichen Mengen an Doxyzyklin für 24, 48, 72 und 96 h behandelt und anschließend mit verschiedenen EBV-spezifischen T-Zellen kokultiviert, die gegen die späten lytischen Antigene BLLF1 und BcLF1 gerichtet waren. Als Kontrolle dienten CD8⁺ T-Zellen, die das sehr frühe lytische Antigen BZLF1 erkannten, sowie CD4⁺ T-Zellen, die spezifisch waren für das Latenzantigen EBNA3C. Eine Antigenerkennung durch die T-Zellen und die damit verbundene Zytokinausschüttung wurde mit Hilfe von IFN γ - oder GM-CSF-ELISA bestimmt.

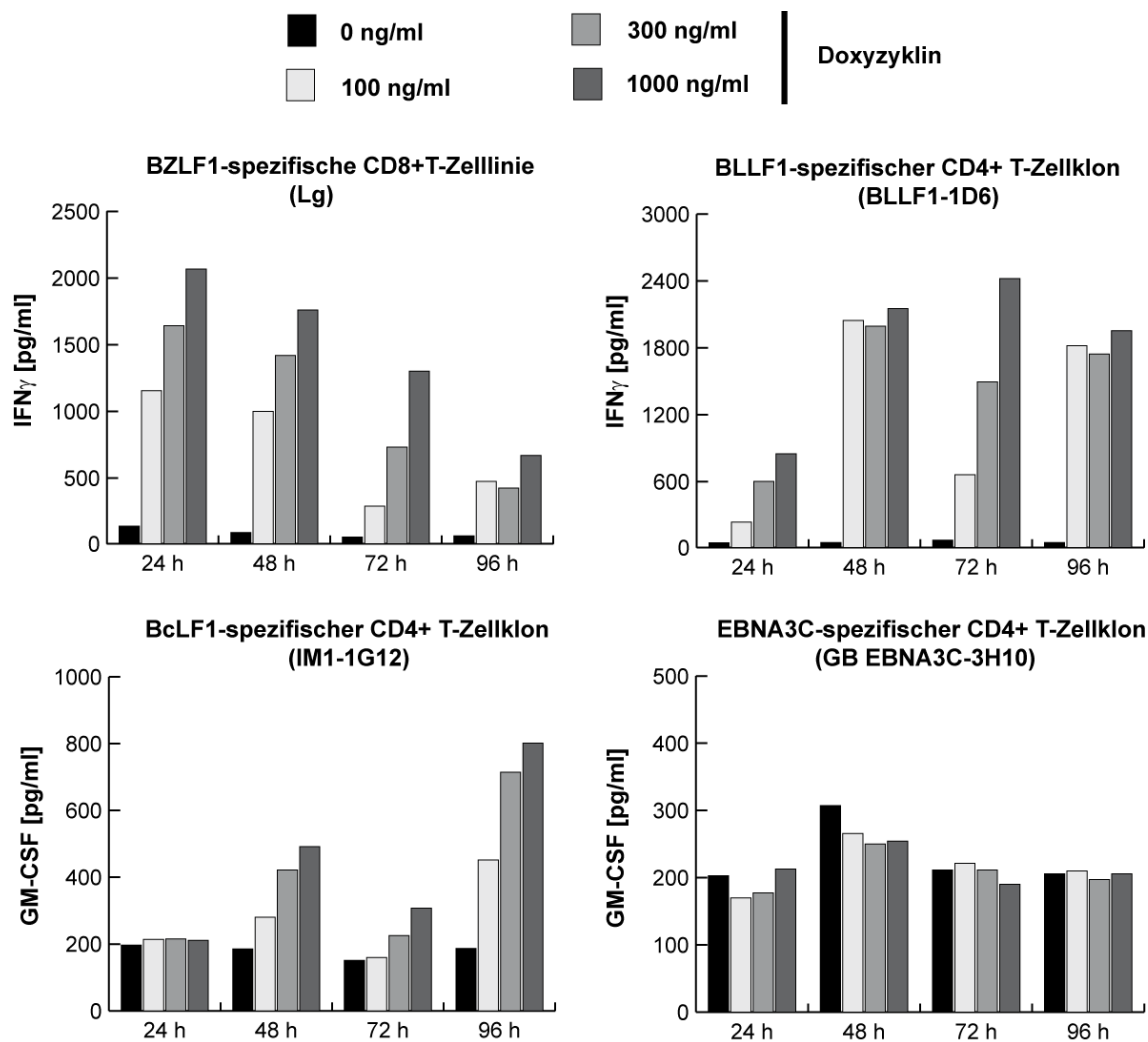


Abbildung 6.9: EBV-spezifische T-Zellerkennung von LCL GB/Tet-BZLF1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der BZLF1-Expression. LCL GB/Tet-BZLF1 wurden für 24, 48, 72, bzw. 96 h mit den angegebenen Doxyzyklinmengen behandelt und anschließend mit der BZLF1-spezifischen CD8⁺ T-Zelllinie Lg, dem BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6, dem BcLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon IM1-1G12 und dem EBNA3C-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon GB EBNA3C-3H10 kokultiviert. Die freigesetzten IFN γ - bzw. GM-CSF-Mengen wurden mittels ELISA gemessen.

Nach Induktion von BZLF1 in den LCL GB/Tet-BZLF1 kam es zu einer raschen und starken Erkennung des Antigens auf den induzierten LCL durch die BZLF1-spezifische CD8⁺ T-Zelllinie Lg (Abbildung 6.9). Die Antigenerkennung korrelierte dabei mit der Doxyzyklinkonzentration: je höher die Doxyzyklinmenge, desto höher die Zytokinausschüttung. Die Erkennung von BZLF1 erfolgte bereits 24 h nach Induktion und nahm über den weiteren Beobachtungszeitraum ab, was vermutlich auf die Metabolisierung

von Doxyzyklin und die dadurch bedingte, verringerte Expression von BZLF1 über die Zeit zurückzuführen war.

Darüber hinaus wurde auch das späte EBV-Antigen BLLF1 durch den Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 bereits innerhalb der ersten 24 h nach Zugabe von Doxyzyklin erkannt. Im Gegensatz zu BZLF1 stieg die T-Zellerkennung über die Zeit weiter an. Die frühe Erkennung von BLLF1 war unerwartet, da es sich hier um ein spät im lytischen Zyklus von EBV exprimiertes Protein handelt. Dagegen erkannte der für das späte lytische Antigen BcLF1 spezifische CD4⁺ T-Zellklon IM1-1G12 die LCL GB/Tet-BZLF1-Zellen erst 48 h nach BZLF1-Induktion. Dieser zeitliche Unterschied in der CD4⁺ T-Zellerkennung könnte auf einem unterschiedlichen Expressionsniveau von BLLF1 und BcLF1 beruhen. Die Doxyzyklin-Behandlung und damit die Induktion des lytischen Zyklus hatten keinen Einfluss auf die Erkennung des Latenzantigens EBNA3C durch EBNA3C-spezifische CD4⁺ T-Zellen. Somit konnten unspezifische Effekte des Antibiotikums oder des lytischen Zyklus auf die Antigenpräsentation ausgeschlossen werden.

Da der BLLF1-spezifischen T-Zellklon die LCL GB/Tet-BZLF1 bereits 24 h nach BZLF1-Induktion erkannte, wurde der Zeitraum von 12-30 h nach Zugabe von Doxyzyklin (1000 ng/ml) alle zwei Stunden analysiert. Dabei wurde sowohl die Erkennung des sehr frühen Antigens BZLF1 durch die CD8⁺ T-Zelllinie Lg, wie auch die des späten Antigens BLLF1 durch den CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6, untersucht. Wie in Abbildung 6.10 gezeigt, war die Kinetik der T-Zellerkennung beider EBV-spezifischen T-Zellen nahezu identisch. Beide erkannten die Zielzellen bereits 12 h nach Induktion der BZLF1-Expression.

Da die Präsentation von Antigenen auf MHC-I innerhalb weniger Stunden erfolgt, war die Erkennung der Zellen durch die BZLF1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen innerhalb dieses Zeitrahmens durchaus erwartet. BLLF1 gehört aber zu den späten lytischen Proteinen, die erst Stunden nach Induktion des lytischen Zyklus exprimiert werden (Yuan et al., 2006). Deshalb war die Erkennung der Zellen durch die BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zu diesem frühen Zeitpunkt nach Induktion unerwartet und legte eine Präsentation der Antigene auf MHC-II bereits vor Virusfreisetzung nahe. Bei diesen T-Zell-experimenten muss allerdings bedacht werden, dass die Antigenpräsentation auch noch während der Kokultur mit den T-Zellen erfolgen kann. Da die Zytokinmessung 16 bis 20 h nach T-Zellzugabe durchgeführt wird, müssen zu den Induktionszeiten weitere

Stunden addiert werden. Dies erschwerte die genaue Festlegung des Zeitpunktes der T-Zellerkennung.

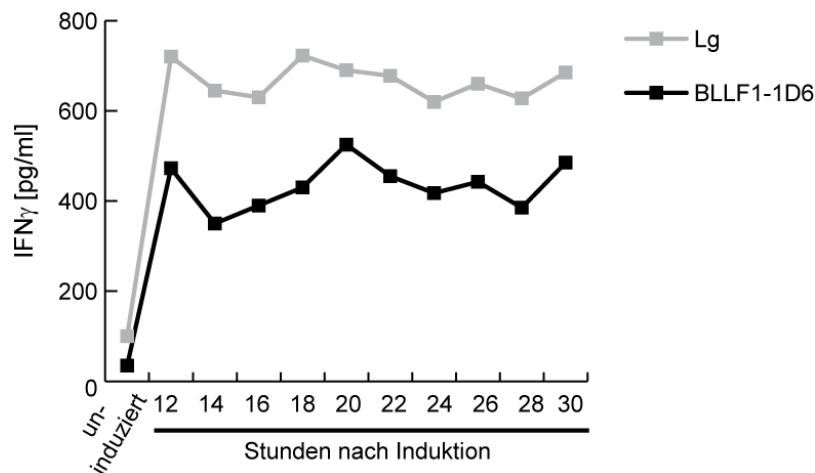


Abbildung 6.10: EBV-spezifische T-Zellerkennung von LCL GB/Tet-BZLF1 im Zeitraum von 12-30 h nach Induktion des lytischen Zyklus. Die BZLF1-Expression in LCL GB/Tet-BZLF1 wurde durch Zugabe von 1000 ng/ml Doxyzyklin induziert. 12-30 h nach Induktion wurde alle zwei Stunden die Erkennung der Zellen durch BZLF1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Lg) und BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (BLLF1-1D6) mittels IFN γ -ELISA untersucht.

6.6 Induktion des lytischen Zyklus in LCL Z(-) mittels BZLF1-Expression

Da die spontane Reaktivierung von EBV in LCL verschiedener Spender starken Schwankungen unterliegt und auch innerhalb einer LCL über die Zeit variieren kann (Adhikary et al., 2008), konnten Ungenauigkeiten bei den zeitkinetischen Untersuchungen in transfizierten LCL nicht ausgeschlossen werden. Deshalb sollte versucht werden, die synchrone Induktion des lytischen Zyklus auch in LCL Z(-) zu etablieren. Aufgrund des Fehlens von BZLF1 können LCL Z(-) keine lytischen Genprodukte exprimieren und folglich auch keine Virionen produzieren. Da eine Überprüfung der Induzierbarkeit des lytischen Zyklus durch TPA-Behandlung in diesen Zelllinien nicht möglich war, wurden mehrere LCL Z(-) von verschiedenen Spendern mit dem BZLF1-Expressionsplasmid Tet-Ery-BZLF1-IRES-NGFR-IV stabil transfiziert. Die lytische Reaktivierung von EBV wurde nach Inkubation der LCL Z(-)-Zelllinien mit Doxyzyklin (1000 ng/ml) für 96 h mittels T-Zellerkennungsanalysen untersucht. Da nicht alle Linien das entsprechende T-Zellrestriktionselement exprimierten, wurden 24 h vor T-Zellzugabe LCL Z(-) JM hinzugefügt. Von den 13 getesteten LCL Z(-) wurden vier von dem

BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon erkannt (Abbildung 6.11); drei separat etablierte Linien des Spenders JM (JM-I, JM-II bzw. JM-III) sowie die LCL Z(-) des Spenders Pt. Die Erkennung dieser LCL Z(-)-Linien wurde nach Induktion des lytischen Zyklus im Folgenden näher untersucht.

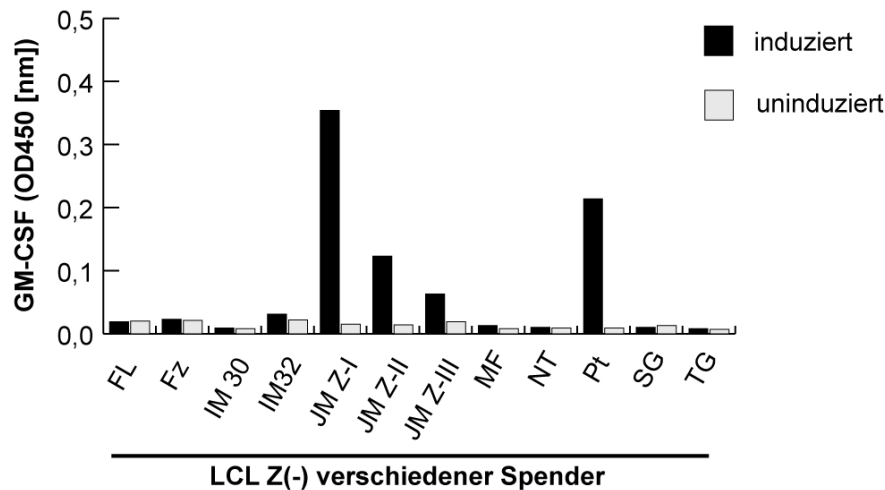


Abbildung 6.11: Untersuchung der Induzierbarkeit des lytischen Zyklus von EBV in LCL Z(-) verschiedener Spender. LCL Z(-) verschiedener Spender und drei separate LCL Z(-) des Spender JM wurden stabil mit dem BZLF1-Expressionsplasmid Tet-Ery-IRES-NGFR-BZLF1-IV transfiziert. Die stabilen Transfektanten wurden mit 1000 ng/ml Doxyzyklin für 96 h behandelt und anschließend die Virusproduktion durch Kokultur mit dem Strukturprotein-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 im GM-CSF-ELISA bestimmt. Da die LCL Z(-) der Spender FL, FZ, IM30, IM32, MF, NT, Pt, SG und TG nicht das restringierende HLA-Allel dieser T-Zellen exprimierten, wurden 24 h vor T-Zellzugabe LCL Z(-) JM 24 h beigemischt.

6.6.1 Untersuchung der sequentiellen Expression lytischer Proteine nach Induktion der BZLF1-Expression in LCL Z(-) JM

Die zeitliche Abfolge der lytischen Genexpression in LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1 wurde mittels Western-Blot-Analysen untersucht. Wie in Abbildung 6.12 dargestellt, wurde BZLF1 bereits 4 h nach Zugabe von Doxyzyklin detektiert, anschließend nahm die Expression von BZLF1 stark zu und nach 24 h wieder ab. Das zweite sehr frühe Antigen BRLF1 konnte erstmals 8 h nach Induktion nachgewiesen werden. Dabei stieg die Proteinmenge bis 24 h nach Induktion an und nahm danach wieder ab. Das frühe Genprodukt BMRF1 wurde 12 h nach Zugabe von Doxyzyklin detektiert und nahm über den Beobachtungszeitraum zu. Dass BZLF1 in dieser transfizierten Zelllinie bereits 4 h nach Doxyzyklinzugabe, in den LCL GB/Tet-BZLF1 aber erst nach 8 h detektiert wurde (Abbildung 6.7), ist vermutlich auf eine höhere Transfektionsrate bei der LCL Z(-) JM-

I/Tet-BZLF1-Linie zurückzuführen. Der Nachweis von GAPDH diene zur Überprüfung der geladenen Proteinmengen.

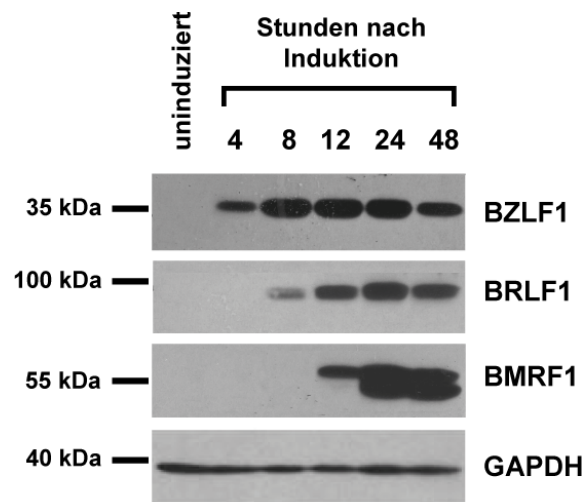
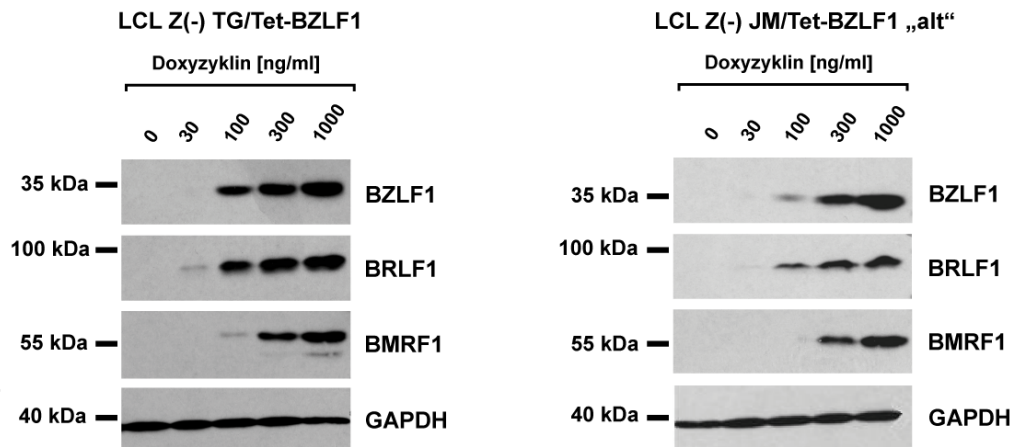


Abbildung 6.12: Expression sehr früher und früher Antigene in LCL Z(-)JM-I/Tet-BZLF1 nach Doxyzyklin-Behandlung. LCLZ(-) JM-Z-I/Tet-BZLF1 wurden durch Zugabe von 1000 ng/ml Doxyzyklin behandelt. Nach 4, 8, 12, 24 und 48 h wurden Zelllysate hergestellt, diese elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die zeitabhängige Expression der lytischen Proteine BZLF1, BRLF1 und BMRF1 wurde mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper und HRP-konjugierten Sekundärantikörpern detektiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH. Abkürzung: HRP, *horseradish peroxidase*

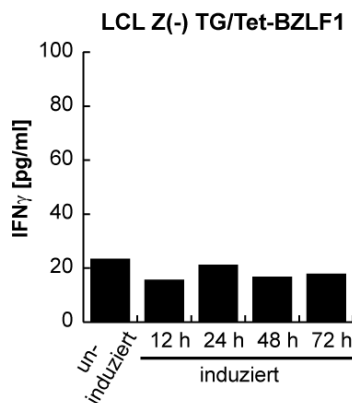
6.6.2 Untersuchung der LCL Z(-), in denen sich EBV nicht reaktivieren ließ

In der Mehrheit der getesteten LCL Z(-) konnte die lytische Replikation von EBV nicht durch Doxyzyklinzugabe induziert werden (Abbildung 6.11). Um zu untersuchen, ob in diesen Linien, beispielsweise aufgrund schlechterer Transfektionseffizienz, weniger BZLF1 exprimiert wurde, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Wie am Beispiel der LCL Z(-) TG und LCL Z(-) JM „alt“ gezeigt, wurde BZLF1 doxyzyklinabhängig hoch exprimiert. Darüber hinaus konnten auch das zweite sehr frühe Antigen BRLF1 und das frühe Antigen BMRF1 auf Proteinebene detektiert werden (Abbildung 6.13a). Somit musste in diesen Zellen ein BZLF1-Expressionsniveau erreicht worden sein, das für die Auslösung der lytischen Kaskade ausreichend war. Dennoch durchliefen diese Zellen scheinbar nicht den kompletten lytischen Zyklus, zumindest kam es zu keiner Virusfreisetzung (Abbildung 6.13b).

a)



b)



c)

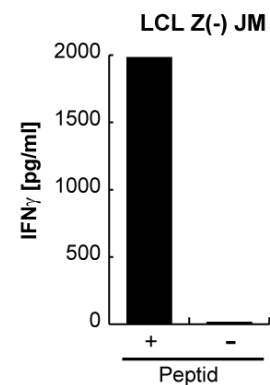
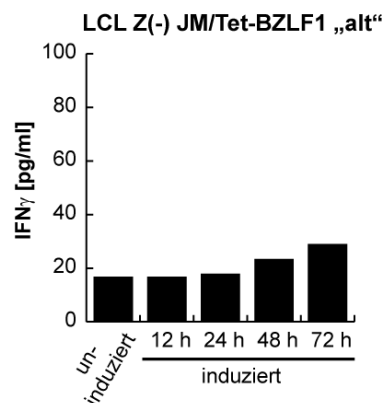


Abbildung 6.13: Untersuchung der Expression lytischer Proteine nach Induktion von BZLF1 in den LCL Z(-) TG/Tet-BZLF1 und LCL Z(-) JM/Tet-BZLF1 „alt“ und deren Erkennung durch den Strukturprotein-spezifischen T-Zellklon BLLF1-1D6. **a)** LCL Z(-) TG/Tet-BZLF1 bzw. LCL Z(-) JM/Tet-BZLF1 „alt“ wurden für 36 h mit unterschiedlichen Mengen an Doxyzyklin behandelt. Anschließend wurden Proteinextrakte hergestellt, diese elektrophoretisch aufgetrennt und durch Western-Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper untersucht. **b)** Das Durchlaufen des kompletten lytischen Zyklus und die damit verbundene Virusproduktion in LCL Z(-) TG/Tet-BZLF1 bzw. LCL Z(-) JM/Tet-BZLF1 „alt“ wurde in einem T-Zellerkennungsversuch getestet. Hierfür wurden die LCL Z(-) TG/Tet-BZLF1 bzw. LCL Z(-) JM/Tet-BZLF1 „alt“ unterschiedlich lange mit 1000 ng/ml Doxyzyklin inkubiert. Im Falle von lytisch infizierten LCL Z(-) TG/Tet-BZLF1 wurde die mögliche Virusproduktion durch Transfer von Kulturüberstand auf LCL Z(-) JM und anschließender Kokultur mit dem BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 im IFN γ -ELISA gemessen. Die Virusproduktion in transfizierten LCL Z(-) JM/Tet-BZLF1 „alt“ wurde durch direkte Kokultur mit dem Strukturprotein-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 im IFN γ -ELISA abgefragt. **c)** Für die Kontrolle der Spezifität der T-Zellen wurden LCL Z(-) JM mit BLLF1-Peptid (2 μ M) beladen. Nach 2 h wurde durch dreimaliges Waschen überschüssiges, nicht gebundenes Peptid entfernt. Der BLLF1-spezifische CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 wurde im Verhältnis 1:1 zugesetzt und die Zytokinsekretion nach 16 h im IFN γ -ELISA gemessen. Als Negativkontrolle dienten unbeladene LCL Z(-) JM.

Interessanterweise stammten die Zelllinien LCL Z(-) JM-II/Tet-BZLF1 und LCL Z(-) JM/Tet-BZLF1 „alt“ von ein und derselben Ursprungslinie ab, wurden aber im ersten Fall durch Transfektion der Zellen kurz nach deren Etablierung bzw. erst nach mehrmonatiger *in vitro* Kultur der Linie generiert (LCL Z(-) JM/Tet-BZLF1 „alt“). Dies deutete darauf hin, dass mit steigender Kultivierungsdauer die Induzierbarkeit der lytischen Replikation von EBV aufgrund epigenetischer Veränderungen abnimmt.

6.6.3 Induktion des lytischen Zyklus in LCL Z(-) des Spenders JM

In Abbildung 6.11 wurde gezeigt, dass der lytische Zyklus von EBV in drei LCL Z(-)-Klonen des Spenders JM durch Induktion der BZLF1-Expression erfolgreich aktiviert werden konnte. Nachfolgend wurde die EBV-spezifische Immunerkennung dieser LCL Z(-)-Linien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des lytischen Zyklus analysiert. Dafür wurden zunächst die mit dem BZLF1-Expressionsplasmid stabil transfizierten Zellen JM-I, JM-II und JM-III mit Doxyzyklin in An- bzw. Abwesenheit von 1% DMSO unterschiedlich lange inkubiert. In unabhängigen Versuchen wurde beobachtet, dass DMSO die Aktivität des bidirektionalen Tetrazyklin-abhängigen Promotors steigert. Anschließend wurde die Virusproduktion mittels Kokultur mit dem BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 im IFN γ -ELISA ermittelt.

In allen drei stabilen LCL Z(-)/Tet-BZLF1-Linien des Spenders JM wurde der lytische Zyklus induziert, wie die steigende Zytokinausschüttung der T-Zellen spezifisch für das spät lytische Genprodukt BLLF1 belegte (Abbildung 6.14). Nach Zugabe von DMSO wurde deutlich mehr Zytokin durch die T-Zellen sezerniert als in Abwesenheit von DMSO. Auch wurden nach DMSO-Behandlung die LCL früher durch die T-Zellen erkannt. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde vermutet, dass DMSO einen verstärkenden Effekt auf die lytische Replikation von EBV hat. In den nachfolgenden Versuchen wurde daher, wenn nicht anders beschrieben, 1% DMSO zusätzlich hinzugefügt.

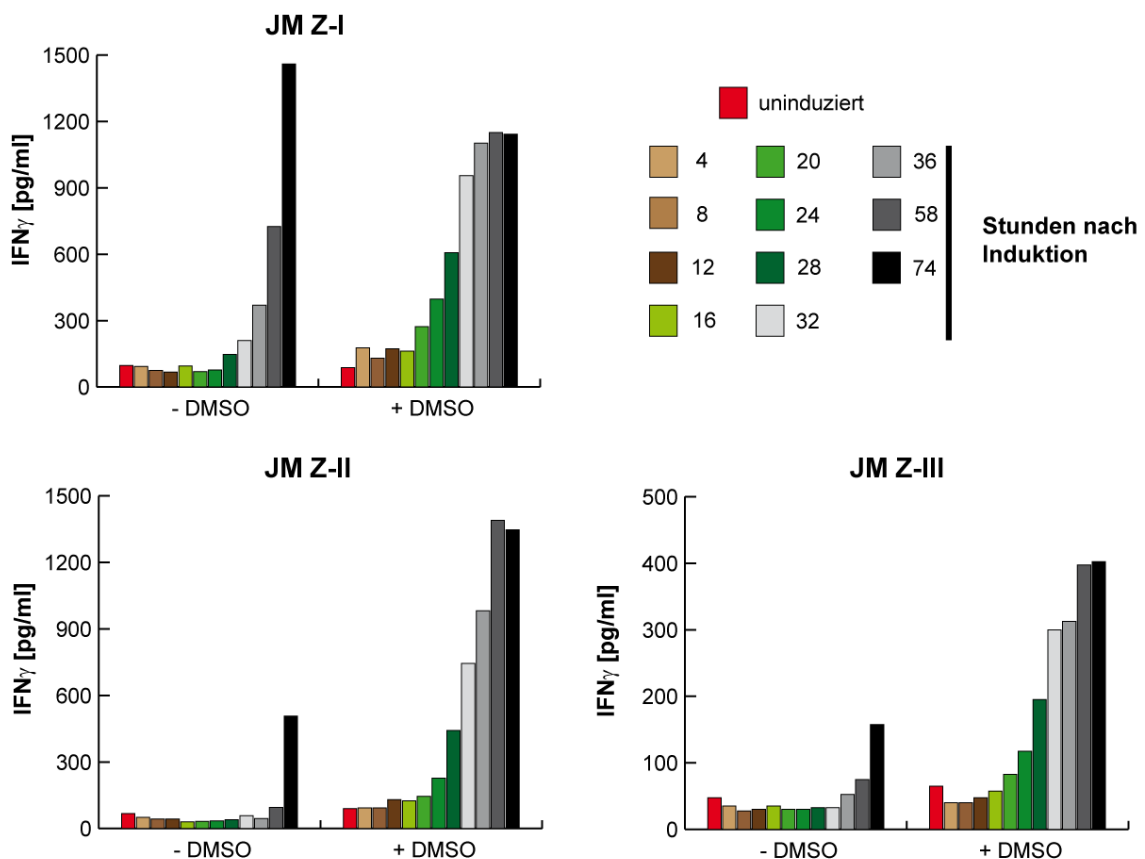


Abbildung 6.14: Induktion des lytischen Zyklus von EBV in drei stabil transfizierten LCL Z(-)-Linien des Spenders JM. Drei separat etablierte LCL Z(-) JM/Tet-BZLF1-Zelllinien wurden für die angegebene Dauer mit 1000 ng/ml Doxyzyklin in An- bzw. Abwesenheit von 1% DMSO inkubiert. Anschließend wurde die Induktion des lytischen Zyklus durch Kokultur mit dem BLLF1-spezifischen T-Zellklon BLLF1-1D6 überprüft. Dabei wurden die freigesetzten Mengen an IFN γ mittels ELISA bestimmt.

Um die Erkennung im Verlauf des lytischen Zyklus näher zu analysieren, wurden die drei induzierbaren LCL Z(-) JM/Tet-BZLF1-Linien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von Doxyzyklin und DMSO mit verschiedenen autologen T-Zellklonen kokulti- viert. Dabei wurde die Erkennung der zwei frühen lytischen Antigene BMLF1 und BMRF1 mit der Erkennung des späten lytischen Antigens BLLF1 verglichen. In Abbildung 6.15 sind die Ergebnisse der T-Zellerkennungsversuche von JM Z-I und JM Z-III dargestellt. Erwartungsgemäß erfolgte die Erkennung der frühen Genprodukte BMLF1 und BMRF1 durch die CD8⁺ T-Zellklone BMLF1-ML2 bzw. BMRF1-MR13 früh nach Induktion des lytischen Zyklus. Bereits vier Stunden nach Doxyzyklinzugabe wur- den die LCL von den T-Zellen erkannt. Die T-Zellerkennung nahm zunächst mit Fort- schreiten der lytischen Replikation weiter zu und nach ein bis zwei Tagen wieder ab.

Dies könnte womöglich auf eine Abnahme der BZLF1-Expression durch die Metabolisierung von Doxzyklin zurückzuführen sein. Die lytisch infizierten LCL Z(-) JM Transfektanten wurden dagegen zu einem deutlich späteren Zeitpunkt von den BLLF1-spezifischen T-Zellklonen BLLF1-1D6 und BLLF1-1H2 erkannt. Die T-Zellerkennung setzte jeweils zwischen 14-28 h nach Doxzyklinzugabe ein und stieg dann über den gesamten Untersuchungszeitraum kontinuierlich an. Ob eine Präsentation der Antigene bereits vor dem Zeitpunkt der Virusfreisetzung stattfand, konnte aber aufgrund des großen Zeitfensters nicht bewertet werden.

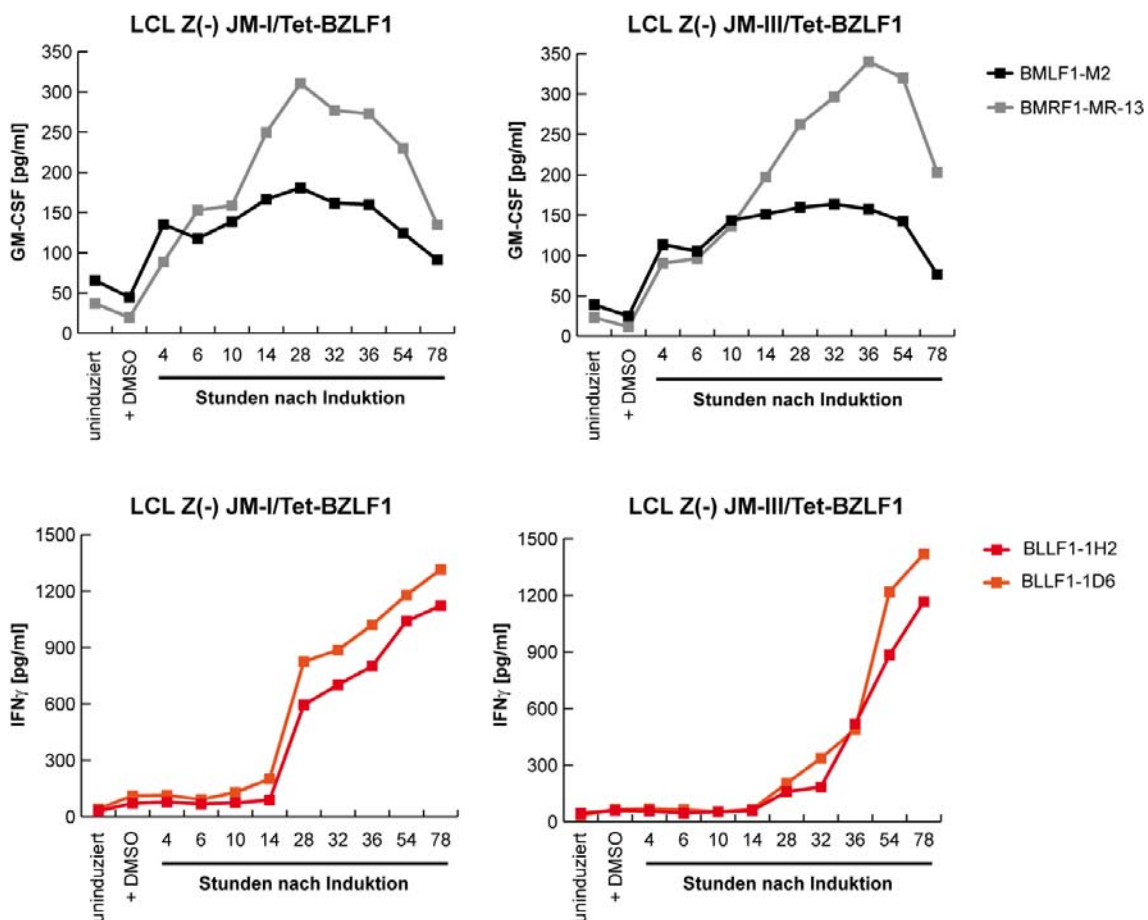
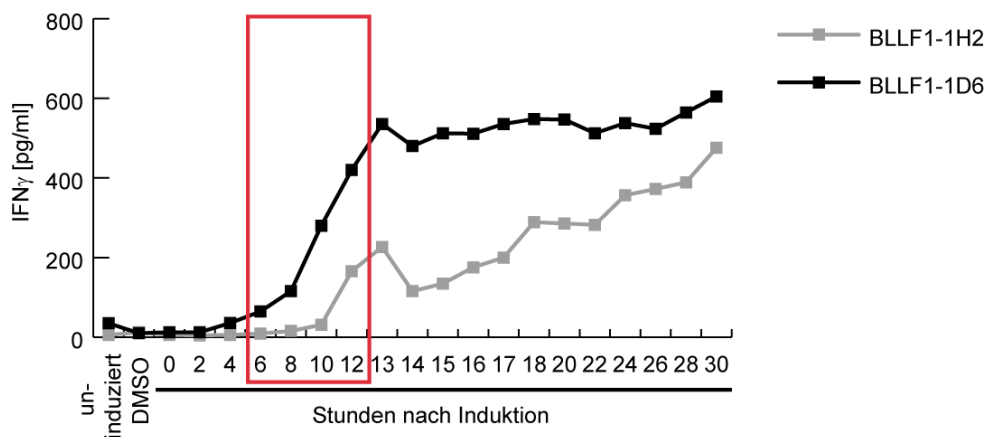


Abbildung 6.15: Kinetik der T-Zellerkennung von frühen und späten lytischen Antigenen nach Induktion des lytischen Zyklus von EBV in zwei stabil transfizierten LCL Z(-) Linien des Spenders JM. LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1 und LCL Z(-) JM-III/Tet-BZLF1 wurden mit Doxzyklin (1000 ng/ml) und DMSO (1%) inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Induktion der EBV-Reaktivierung durch Kokultur mit EBV-spezifischen T-Zellen überprüft. Dabei wurde die Erkennung der zwei frühen Antigene BMLF1 und BMRF1 durch den BMLF1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon BMLF1-ML2 bzw. den BMRF1-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon BMRF1-MR13 abgefragt. Durch Kokultur mit den zwei BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen BLLF1-1D6 und BLLF1-1H2 wurde die Erkennung des späten Strukturproteins BLLF1 nachgewiesen. Die freigesetzten IFN γ - bzw. GM-CSF-Mengen wurden mittels ELISA gemessen.

Um Hinweise auf eine mögliche Präsentation des späten Antigens BLLF1 auf MHC-II bereits vor Virusfreisetzung zu erhalten, wurden nachfolgend Doxyzyklin-behandelte LCL Z(-)JM-I/Tet-BZLF1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion mit BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen kokultiviert und parallel dazu Kulturüberstand der Zellen gewonnen, auf LCL Z(-) JM geladen und als Zielzellen für die BLLF1-spezifischen T-Zellen eingesetzt (Abbildung 6.16).

a) direkte Erkennung von LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1



b) Virusfreisetzung aus LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1

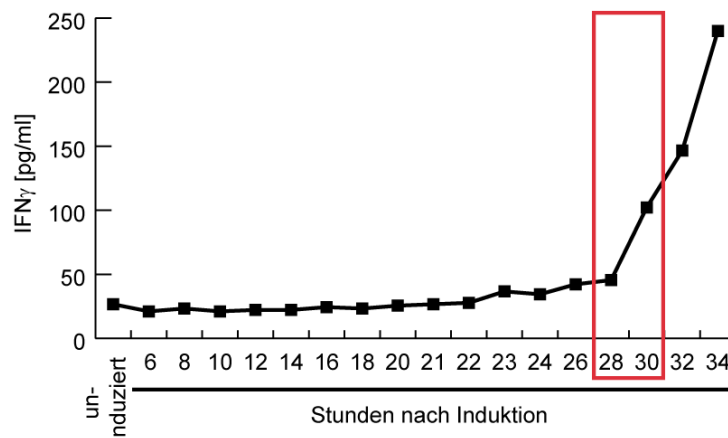


Abbildung 6.16: Vergleich der Kinetik der direkten Erkennung von lytisch infizierten Zellen durch BLLF1-spezifische T-Zellen mit dem Zeitpunkt der Virusfreisetzung. a) LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1 wurden mit Doxyzyklin (1000 ng/ml) und DMSO (1%) behandelt. Die Erkennung des späten lytischen Antigens BLLF1 wurde durch Kokultur mit den BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen BLLF1-1D6 bzw. BLLF1-1H2 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion abgefragt. **b)** Parallel dazu wurden nach verschiedenen Zeitpunkten Zellüberstände der induzierten LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1 gesammelt und 10-fach konzentriert. Durch den Transfer von Kulturüberständen auf LCL Z(-) JM und anschließender Kokultur mit den Strukturprotein-spezifischen CD4⁺ T-Zellen BLLF1-1D6 wurde der Zeitpunkt der Freisetzung infektiöser Viruspartikel bestimmt. Die freigesetzten Mengen an IFN γ wurden mittels ELISA gemessen.

Der T-Zellklon BLLF1-1D6 erkannte lytisch infizierte LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1 bereits 6-8 h, der T-Zellklon BLLF1-1H2 10-12 h nach Doxyzyklinzugabe (Abbildung 6.16a). Dagegen konnten Viruspartikel im Kulturüberstand erst ab 28-30 h nach Induktion des lytischen Zyklus nachgewiesen werden (Abbildung 6.16b). Dennoch muss auch hier bedacht werden, dass noch während der mehrstündigen Kokultur mit T-Zellen eine Antigenpräsentation stattfinden kann und daher der genaue Zeitpunkt der CD4⁺ T-Zellerkennung nicht bestimmt werden konnte. Somit war immer noch unklar, ob tatsächlich eine MHC-II-restringierte Immunerkennung später lytischer Antigene stattfand, bevor Virionen aus lytisch infizierten Zellen freigesetzt wurden.

6.6.4 CD4⁺ T-Zellen erkennen lytisch EBV-infizierte B-Zellen nicht vor Freisetzung von Virusnachkommen

Aufgrund des wiederkehrenden Problems, dass in den durchgeführten T-Zellerkennungsversuchen auch noch während der Kokultur mit T-Zellen eine Antigenpräsentation und Virusfreisetzung stattfinden konnte, war es bislang nicht möglich, Aussagen über eine Erkennung lytisch infizierter Zellen durch CD4⁺ T-Zellen vor Virusfreisetzung zu machen. Um daher das Zeitfenster der CD4⁺ T-Zellerkennung von lytischen Antigenen genauer definieren zu können, wurden zwei weitere experimentelle Ansätze erprobt. Zum einem wurde der Zeitpunkt der Zytokinfreisetzung der T-Zellen nach Antigenerkennung bestimmt. Zum anderen wurden die stabil transfizierten Zelllinien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des lytischen Zyklus mit PFA fixiert, um eine Antigenpräsentation während der Kokultur mit T-Zellen zu verhindern. Ein experimenteller Nachteil dieses Versuchs ist jedoch, dass die PFA-bedingte Quervernetzung von Proteinen zu einer Versteifung der Zelloberfläche und damit zu einer Verringerung des T-Zellsignals führt. Das kann dazu führen, dass eine schwache Antigenerkennung nach PFA-Fixierung nicht mehr detektiert werden kann.

Um den Zeitpunkt, wann T-Zellen nach Antigenerkennung Zytokine ausschütten, genauer zu bestimmen, wurden sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen getestet. Hierfür wurden 2×10^6 der entsprechenden LCL mit 2 μ M Peptid für 1 h beladen, danach mehrmals gewaschen und anschließend je 1×10^5 dieser LCL mit 1×10^5 antigenspezifischen T-Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte kokultiviert. Alle getesteten T-Zellen begannen 2 bis 4 h nach Antigenerkennung Zytokine auszuschütten und bereits nach 6 bis 8 h wurde das Maximum erreicht (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass diese unerwartet frühe Zytokinsekretion auf der unnatürlich starken Stimulation durch

Peptid-beladenen Zielzellen beruhte, wurde parallel dazu überprüft, ab welchem Zeitpunkt Strukturprotein-spezifische T-Zellen Zytokine sezernieren, wenn sie mit LCL kokultiviert werden. Dabei wurde die Zelllinie LCL JM „spontan“ verwendet, die das rest-ringierende HLA-Molekül HLA DRB1*1301 exprimierte und zudem einen relativ hohen Anteil an lytisch infizierten Zellen aufwies. Auch in diesem Versuch wurde bereits nach 4 h eine zunehmende Zytokinausschüttung durch die BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen beobachtet (Abbildung 6.17a). In nachfolgenden Experimenten wurde getestet, ob bereits eine 4-stündige Kokultur von T-Zellen mit den induzierbaren, BZLF1-transfizierten Zelllinien ausreichte, um eine Zytokinausschüttung nachzuweisen. Hierfür wurden LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1 mit 1000 ng/ml Doxyzyklin für 10, 13 16 und 38 h behandelt und anschließend für 4 h mit dem BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 kokultiviert. Wie in Abbildung 6.17b zu sehen, erkannten die BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ihr Antigen 38 h nach Induktion des lytischen Zyklus und damit zu einem deutlich späteren Zeitpunkt als in früheren Experimenten. Zusammen mit den Ergebnissen der Zytokinfreisetzung nach Peptidbeladung und nach Kokultur mit LCL deutete dies darauf hin, dass eine CD4⁺ T-Zellerkennung von BLLF1 erst nach Virusfreisetzung erfolgte.

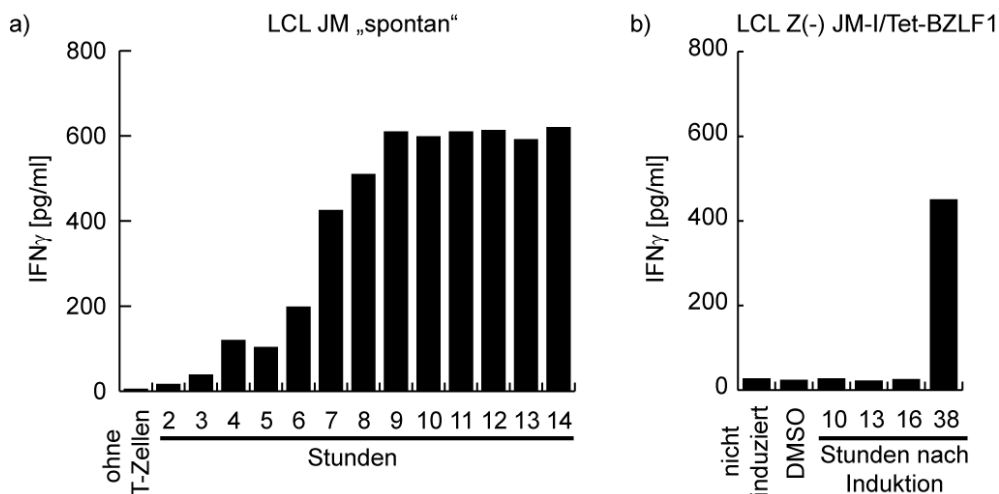


Abbildung 6.17: Bestimmung des Zeitpunktes der Zytokinfreisetzung durch T-Zellen nach Stimulation mit lytisch infizierten Zellen und nach Induktion des lytischen Zyklus in LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1. **a)** LCL JM „spontan“ wurden mit dem BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 für die angegebenen Zeitpunkte kokultiviert. **b)** LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1 wurden für 10, 13, 16 bzw. 38 h mit Doxyzyklin (1000 ng/ml) und DMSO (1%) behandelt und anschließend mit dem CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 für 4 h kokultiviert. Die freigesetzten IFN γ -Mengen wurden mittels ELISA gemessen.

Um zu verhindern, dass während des Zeitraums zwischen T-Zellzugabe und Zytokinmessung der lytische Zyklus von EBV weiter fortlaufen konnte und es in dieser Zeitspanne zur Antigenpräsentation und Virusfreisetzung kam, wurde eine Kinetik mit anschließender PFA-Fixierung der Zellen durchgeführt. Die BZLF1-Expression in LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1 wurde durch Zugabe von Doxyzyklin (1000 ng/ml) induziert und dann zu verschiedenen Zeitpunkten die Zellüberstände gesammelt um die Virusproduktion zu überprüfen. Parallel dazu wurde ein Teil der Zellen mit 0,5% PFA für 5 min fixiert, die Zellen mehrmals gewaschen und anschließend die fixierten und nicht-fixierten Zellen mit dem BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 und zur Kontrolle mit BMRF1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen BMRF1-MR13 kokultiviert.

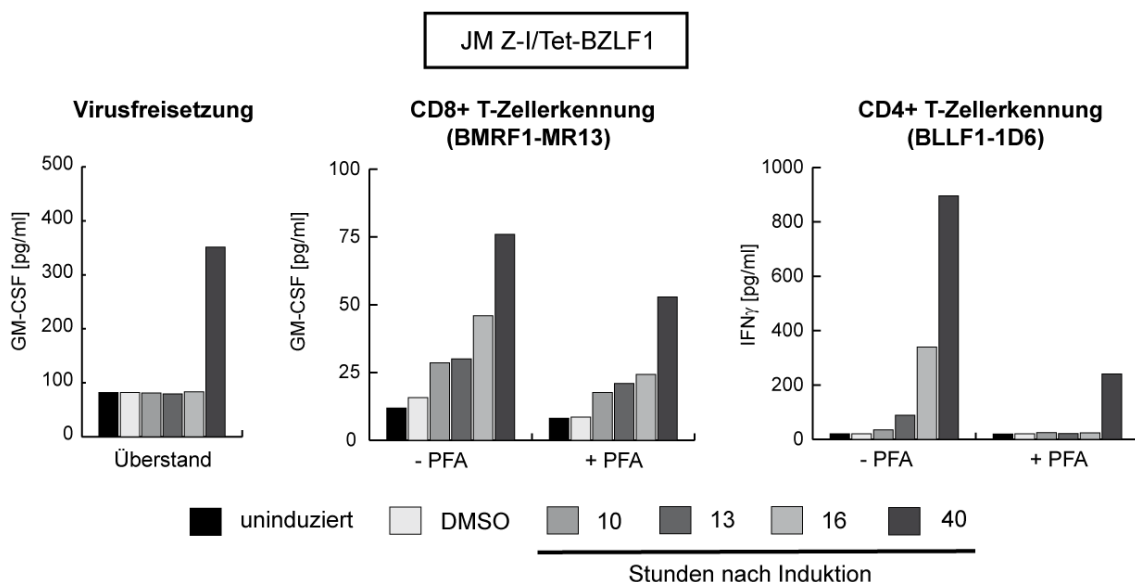


Abbildung 6.18: Lytisch infizierte Zelllinien werden nicht direkt von CD4⁺ T-Zellen erkannt. Die BZLF1-Expression in LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1 wurde mit Doxyzyklin (1000 ng/ml) und DMSO (1%) induziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen entweder mit 0,5% PFA fixiert oder unbehandelt mit EBV-spezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen (BMRF1-MR13 bzw. BLLF1-1D6) kokultiviert und eine Antigenerkennung mittels IFN γ - oder GM-CSF-ELISA bestimmt. Zusätzlich wurde der Kulturüberstand von den induzierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt, 10-fach konzentriert und für 24 h auf LCL Z(-) JM geladen. Nach anschließender Kokultur mit den BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 wurden die freigesetzten GM-CSF-Mengen mittels ELISA gemessen und dadurch der Zeitpunkt der Virusfreisetzung ermittelt.

Abbildung 6.18 zeigt, dass 40 h nach Induktion der BZLF1-Expression Viruspartikel im Zellüberstand von LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1 nachweisbar waren. Die unfixierten sowie die fixierten Zellen wurden innerhalb der ersten 13 h nach Doxyzyklinzugabe von den

BMRF1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen (BMRF1-MR13) erkannt, auch wenn das T-Zell-signal bei den PFA-fixierten Zellen deutlich niedriger war. Dies deutete darauf hin, dass nach PFA-Behandlung der Zellen zwar das T-Zellsignal der BMRF1-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen abnahm, aber nicht der Zeitpunkt der $CD8^+$ T-Zellerkennung beeinflusst wurde. Dagegen fand die Strukturprotein-spezifische $CD4^+$ T-Zellantwort nach PFA-Fixierung erst nach 40 h und somit nach Virusfreisetzung statt.

Diese Ergebnisse zeigten, dass Strukturantigen-spezifische $CD4^+$ T-Zellen lytisch infizierte Zellen nicht direkt erkennen. Somit erfolgt eine EBV-spezifische $CD4^+$ T-Zellantwort erst nach Virusfreisetzung aus lytisch infizierten Zellen und anschließender $CD21$ -vermittelter Aufnahme und Prozessierung der viralen Strukturproteine durch benachbarte Zellen. Ob lytische Genprodukte über einen endogenen oder nur über den exogenen Präsentationsweg auf MHC-II geladen werden können, oder ob immunmodulatorische Proteine von EBV direkt mit der $CD4^+$ T-Zellerkennung interferieren, war zunächst unklar.

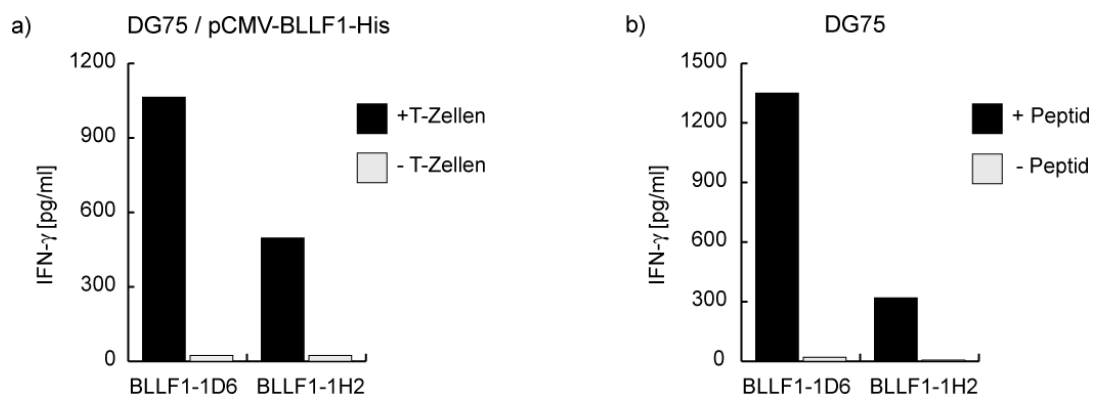


Abbildung 6.19: BLLF1-Antigene können über einen endogenen Präsentationsweg auf MHC-Klasse-II präsentiert werden. **a)** Das Plasmid pCMV-BLLF1-His (20 µg) wurde mittels Elektroporation in 1×10^7 DG75-Zellen eingebracht und diese für 24 h kultiviert. Die Erkennung von BLLF1 auf MHC-II wurde durch Kokultur der transfizierten Zellen (1×10^5) mit den Strukturprotein-spezifischen $CD4^+$ T-Zellklonen BLLF1-1D6 bzw. BLLF1-1H2 (1×10^5) im $IFN\gamma$ -ELISA abgefragt. Als Negativkontrolle wurden transfizierte DG75-Zellen ohne T-Zellen mitgeführt. **b)** Zur Kontrolle der Spezifität der T-Zellen wurden DG75 mit 2 µM des jeweiligen BLLF1-Peptids beladen. Nach 2 h wurde durch dreimaliges Waschen überschüssiges, nicht gebundenes Peptid entfernt, die BLLF1-spezifischen $CD4^+$ T-Zellklone (BLLF1-1D6 oder BLLF1-1H2) zugeführt und die Zytokinsekretion nach 16 h im $IFN\gamma$ -ELISA gemessen. Als Negativkontrolle dienten unbeladene DG75.

Dass lytische Genprodukte prinzipiell über einen endogenen Präsentationsweg auf MHC-II geladen werden können, wurde dadurch belegt, dass die EBV-negative BL-Zelllinie DG75 nach Transfektion mit einem BLLF1-Expressionsplasmid (pCMV-BLLF1-His) von beiden BLLF1-spezifischen T-Zellklonen BLLF1-1D6 und BLLF1-1H2 erkannt wurde (Abbildung 6.19).

6.6.5 BZLF2 beeinflusst nicht die CD4⁺ T-Zellerkennung von lytisch EBV-infizierten Zellen.

Als möglicher Grund für die fehlende Erkennung lytisch infizierter Zellen kam ein immunmodulatorischer Einfluss des Proteins BZLF2 in Betracht. Für BZLF2 war vorher beschrieben, dass es sterisch mit der CD4⁺ T-Zellerkennung von Antigenen auf MHC-II interferierte (Ressing et al., 2003, Ressing et al., 2005). Deshalb wurden mit Hilfe einer EBV-Mutante (zur Verfügung gestellt von Prof. Delecluse, DKFZ Heidelberg), der sowohl das *BZLF1*- wie auch *BZLF2*-Gen fehlte, LCL generiert (LCL BZLF2(-)). Die LCL BZLF2(-) wurden mit den Vektoren Tet-Ery-BZLF1-IRES-NGFR-IV und BZLF2-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1 transfiziert und dadurch die stabilen Transfektanten LCL BZLF2(-)/Tet-BZLF1 bzw. LCL BZLF2(-)/BZLF2-BZLF1 etabliert. In LCL BZLF2(-)/Tet-BZLF1 konnte durch Zugabe von Doxyzyklin die Expression von BZLF1, in LCL BZLF2(-)/BZLF2-BZLF1 durch Zugabe von Erythromycin und Doxyzyklin die Expression von BZLF2 und BZLF1 induziert werden. Um den Einfluss von BZLF2 auf die Strukturprotein-spezifische CD4⁺ T-Zellerkennung von diesen Zelllinien nach Induktion des lytischen Zyklus zu untersuchen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe von Doxyzyklin bzw. Erythromycin und Doxyzyklin ein Teil der Zellen fixiert, anschließend fixierte und nicht-fixierte Zellen mit dem BLLF1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon BLLF1-1D6 kointekultiert und die T-Zellerkennung sowie die damit verbundene Zytokinausschüttung mittels ELISA gemessen. Zusätzlich wurde der Kulturüberstand gesammelt, 10-fach konzentriert und LCL Z(-) für 24 h damit beladen, um den Zeitpunkt der Virusfreisetzung zu bestimmen. Beide Zelllinien wurden nicht direkt, sondern erst nach Virusfreisetzung erkannt. Die Expression von BZLF2 führte zu keiner messbaren Verschlechterung der Antigenerkennung (Abbildung 6.20). Die beschriebene, inhibitorische Eigenschaft von BZLF2 kann daher als Grund für die Hemmung der MHC-II-restingierten T-Zellerkennung ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass weitere, bislang noch nicht näher charakterisierte virale Genprodukte die Erkennung lytisch infizierter B-Zellen durch $CD4^+$ T-Zellen inhibieren.

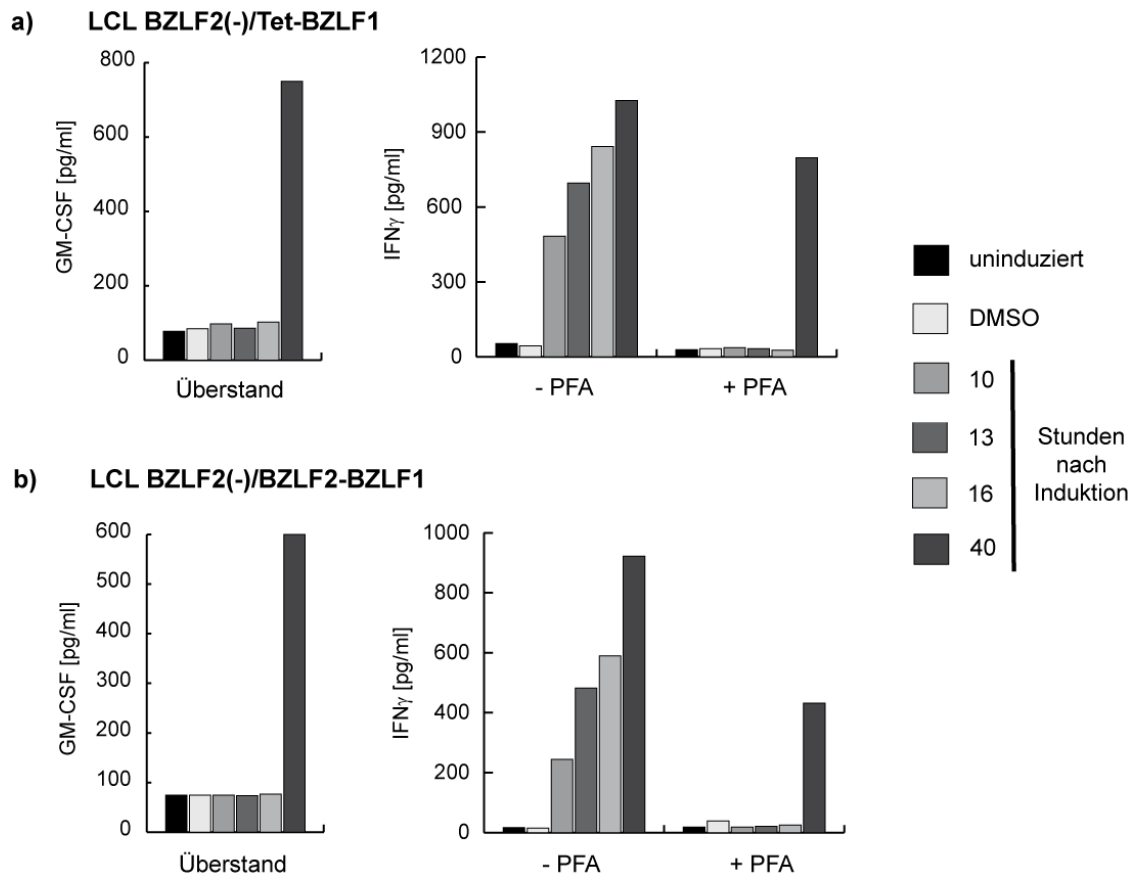


Abbildung 6.20: Das späte lytische Genprodukt BZLF2 interferiert nicht mit der $CD4^+$ T-Zellerkennung von lytisch infizierten Zelllinien. Die BZLF1-Expression in LCL BZLF2(-)/Tet-BZLF1 wurde mit Doxyzyklin (1000 ng/ml) und DMSO (1%) **(a)** und die Expression von BZLF1 sowie BZLF2 in LCL BZLF2(-)/BZLF2-BZLF1 mit Doxyzyklin und Erythromycin (je 1000 ng/ml) und DMSO (1%) **(b)** induziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen entweder mit 0,5% PFA fixiert oder unbehandelt mit dem BLLF1-spezifischen $CD4^+$ T-Zellklon BLLF1-1D6 kokultiviert und eine Antigenerkennung mittels $IFN\gamma$ -ELISA bestimmt. Zusätzlich wurde der Kulturüberstand von den induzierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt, 10-fach konzentriert und für 24 h auf LCL Z(-) JM geladen. Der Zeitpunkt der Virusfreisetzung wurde durch die anschließende Kokultur mit den Strukturprotein-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen (BLLF1-1D6) und der Messung der freigesetzten GM-CSF-Mengen mittels ELISA ermittelt.

6.7 Untersuchung des Einflusses einzelner lytischer EBV-Proteine auf die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-restringierte Antigenpräsentation

In lytisch infizierten Zellen nimmt die Expression von MHC-I auf der Zelloberfläche deutlich ab. Auch die Expression von MHC-II nimmt in der späten Phase des lytischen Zyklus ab, aber in geringerem Maße als die von MHC-I (Keating et al., 2002). In letzter Zeit mehren sich Hinweise darauf, dass lytische Genprodukte von EBV für diesen Unterschied verantwortlich sind (Ressing et al., 2008). Diese Hinweise basieren allerdings meist auf Experimenten, in denen einzelne Genprodukte von EBV in heterologen Zellsystemen überexprimiert wurden. Eine dezidierte Untersuchung möglicher immunmodulatorischer Funktionen lytischer Genprodukte im Rahmen des lytischen Zyklus von EBV war bislang aufgrund fehlender geeigneter, konditionaler Zellsysteme kaum möglich. Mit Hilfe des beschriebenen Zellsystems sollten in zweiten Teil dieser Arbeit die experimentellen Grundlagen für diese Untersuchungen geschaffen werden.

6.7.1 Etablierung konditionaler Antigenpräsentationssysteme

In einem ersten Schritt sollte dazu ein Expressionssystem basierend auf den bereits beschriebenen, Tet-regulierbaren Vektoren etabliert werden. Da sich die Hinweise darauf mehren, dass Antigene, die auf MHC-I präsentiert werden, von neu-synthetisierten Proteinen abstammen (Yewdell et al., 1996, Shastri et al., 2005), erschien eine zeitgleiche Expression von Antigen und immunmodulatorischen Proteinen vom bidirektionalen Tetrazyklin-regulierten Promotor als wenig zielführend. In diesem Fall würde Antigenpräsentation stattfinden bis ein genügend hohes Expressionsniveau des Immunmodulators erreicht wäre, was für unterschiedliche Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Fall sein könnte und damit eine vergleichende Bewertung verschiedener Immunmodulatoren erschweren würde. Deshalb sollte die Antigenexpression zeitlich verzögert von der Expression des Immunmodulators erfolgen. Dafür sollte auf die bereits beschriebenen, im Labor etablierten Tet/Ery-Vektoren zurückgegriffen werden. Als Modellantigene für die Antigenpräsentations-Versuche wurden zwei latente Genprodukte, das Kern-ständige Protein EBNA3C und das Membranprotein LMP2A sowie das lytische Antigen BZLF1 ausgewählt. Die hierfür kodierenden Gene wurden unter die Kontrolle des Erythromycin-Promotors und die potentiell immunmodulatorischen Gene unter die Kontrolle des bidirektionalen Doxzyklin-regulierbaren Promotors kloniert

(Abbildung 6.21). Als Negativkontrolle diente GFP. Um den Anteil an transfizierten Zellen auch im Falle der Expression der immunmodulatorischen Gene einfach ermitteln zu können, wurde das *GFP* durch eine IRES an die immunmodulatorischen Gene angefügt. Folgende vier lytische Genprodukte von EBV sollten in diese Untersuchungen einbezogen werden: BGLF5, BILF1, BNLF2a und BZLF2. Während von den ersten drei Proteinen beschrieben war, dass sie die Präsentation von Antigenen auf MHC-I inhibieren, interferiert BZLF2 mit der Erkennung von Antigen durch CD4⁺ T-Zellen (Ressing et al., 2008, Rowe and Zuo, 2010). Als Positivkontrolle wurde zusätzlich ICP47 mitgeführt. ICP47 ist ein Protein des HSV, das die Präsentation von Antigenen auf MHC-I durch Inhibierung des TAP-Komplexes sehr effizient blockiert (Fruh et al., 1995, Hill et al., 1995). Zudem wurde die extrazelluläre Domäne des NGFR unter die Kontrolle des bidirektionalen Doxyzyklin-regulierbaren Promotors kloniert, um eine Anreicherung von transfizierten Zellen mittels magnetischer Zellsortierung zu ermöglichen (Abbildung 6.21).

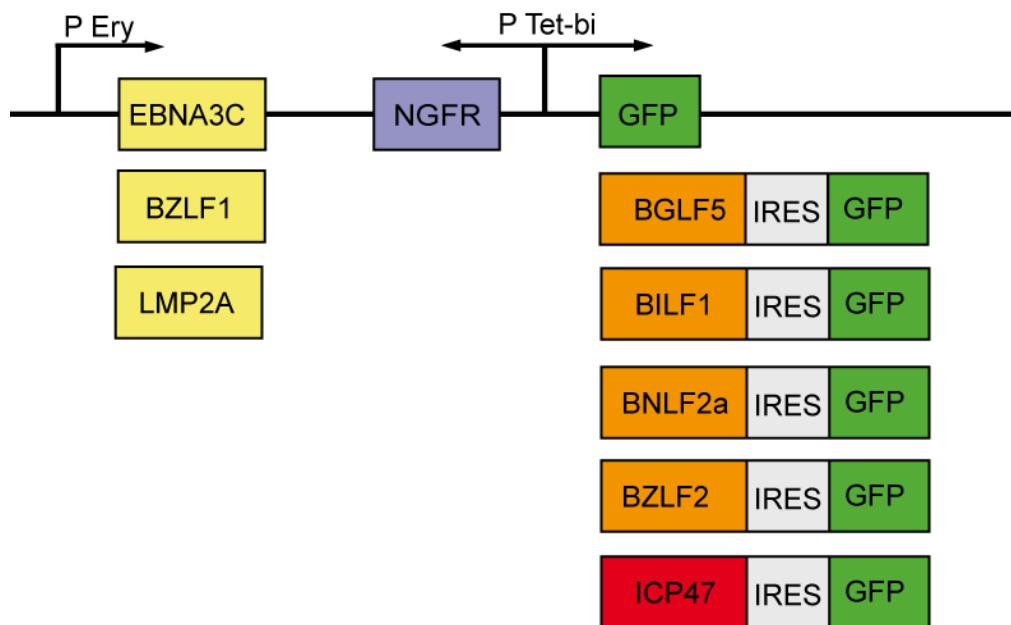


Abbildung 6.21: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionsplasmide. Die immunmodulatorischen Gene *BGLF5*, *BILF1*, *BNLF2a* und *BZLF2* von EBV und das immunmodulatorische Gen *ICP47* von HSV wurden gemeinsam mit GFP unter die Kontrolle des Doxyzykin-regulierbaren, bidirektionalen Promotors kloniert. Dabei waren die immunmodulatorischen Gene und das *GFP*-Gen durch eine interne Ribosomen-Bindestelle voneinander getrennt. Als Negativkontrolle diente GFP alleine. Ebenfalls unter die Kontrolle des bidirektionalen Promotors wurde die kodierende Sequenz des NGFR eingebracht. Die Expression der drei Modellantigene EBNA3C, LMP2A und BZLF1 dagegen unterlag der Kontrolle des Erythromycin-regulierbaren Promotors. Dadurch konnte die Expression von immunmodulatorischen Genen unabhängig von der Expression des Antigens induziert werden. Als Negativkontrolle diente GFP. Abkürzungen: P Tet-bi, bidirektionaler Tetrazyklin-regulierbarer Promotor; P Ery, Erythromycin-regulierbarer Promotor; IRES, interne ribosomale Eintrittsstelle (*internal ribosomal entry site*); NGFR, Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (*nerve growth factor receptor*); GFP, grünfluoreszierendes Protein.

6.7.2 Nachweis der induzierbaren Expression der Antigene nach stabiler Transfektion der Plasmide in LCL

Um den Einfluss der verschiedenen immunmodulatorischen Proteine auf die Präsentation des latenten Antigens EBNA3C zu bestimmen, wurden die folgenden Expressionsplasmide (Tabelle 6.2) mittels Elektroporation stabil in LCL GB-Ag eingebracht. Diese Zelllinie wurde durch Infektion primärer B-Zellen mit Typ II EBV generiert. Typ I und II EBV weisen hauptsächlich Unterschiede in der Sequenz der Latenzantigene auf (Dambaugh and Kieff, 1982, Sample et al., 1990). Die hier verwendeten EBNA3C-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wie auch der zur Verfügung stehende EBNA3C-

spezifische, monoklonale Antikörper, erkannten nur Typ I EBNA3C, so dass das konstitutiv exprimierte, endogene EBNA3C diese Untersuchungen nicht beeinträchtigte. Die transfizierten Zellen wurden mit Hilfe magnetischer Zellsortierung angereichert und so die in Tabelle 6.2 aufgelisteten Transfektanten generiert.

Tabelle 6.2: EBNA3C-Expressionsplasmide und die generierten LCL GB-Ag-Zelllinien

Plasmid	Bezeichnung der generierten Zelllinien
Tet-Ery-Doxy-NGFR-EBNA3C	GB Ag/Tet-EBNA3C
BGLF5-Tet-Ery-Doxy-NGFR-EBNA3C	GB Ag/BGLF5-EBNA3C
BILF1-Tet-Ery-Doxy-NGFR-EBNA3C	GB Ag/BILF1-EBNA3C
BNLF2a-Tet-Ery-Doxy-NGFR-EBNA3C	GB Ag/BNLF2a-EBNA3C
BZLF2-Tet-Ery-Doxy-NGFR-EBNA3C	GB Ag/BZLF2-EBNA3C
ICP47-Tet-Ery-Doxy-NGFR-EBNA3C	GB Ag/ICP47-EBNA3C

Der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Ferner wurde die induzierbare Expression von EBNA3C in den stabil transfizierten LCL GB Ag-Linien nach 36 h Inkubation mit unterschiedlichen Mengen an Doxzyklin und Erythromycin auf Proteinebene mittels Western-Blot analysiert. Wie in Abbildung 6.22 gezeigt, exprimierten die Zellen in allen generierten Zelllinien nach Zugabe von Doxzyklin GFP. Allerdings war der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen in diesen Zelllinien sehr unterschiedlich. Diese Unterschiede beruhten wahrscheinlich auf einer stark variierenden Transfektionseffizienz oder auf zelltoxischen Effekten der immunmodulatorischen Proteine. In allen Zelllinien konnte jedoch das Modellantigen EBNA3C mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Die Induktion der EBNA3C-Expression war dabei abhängig von Doxzyklin und Erythromycin.

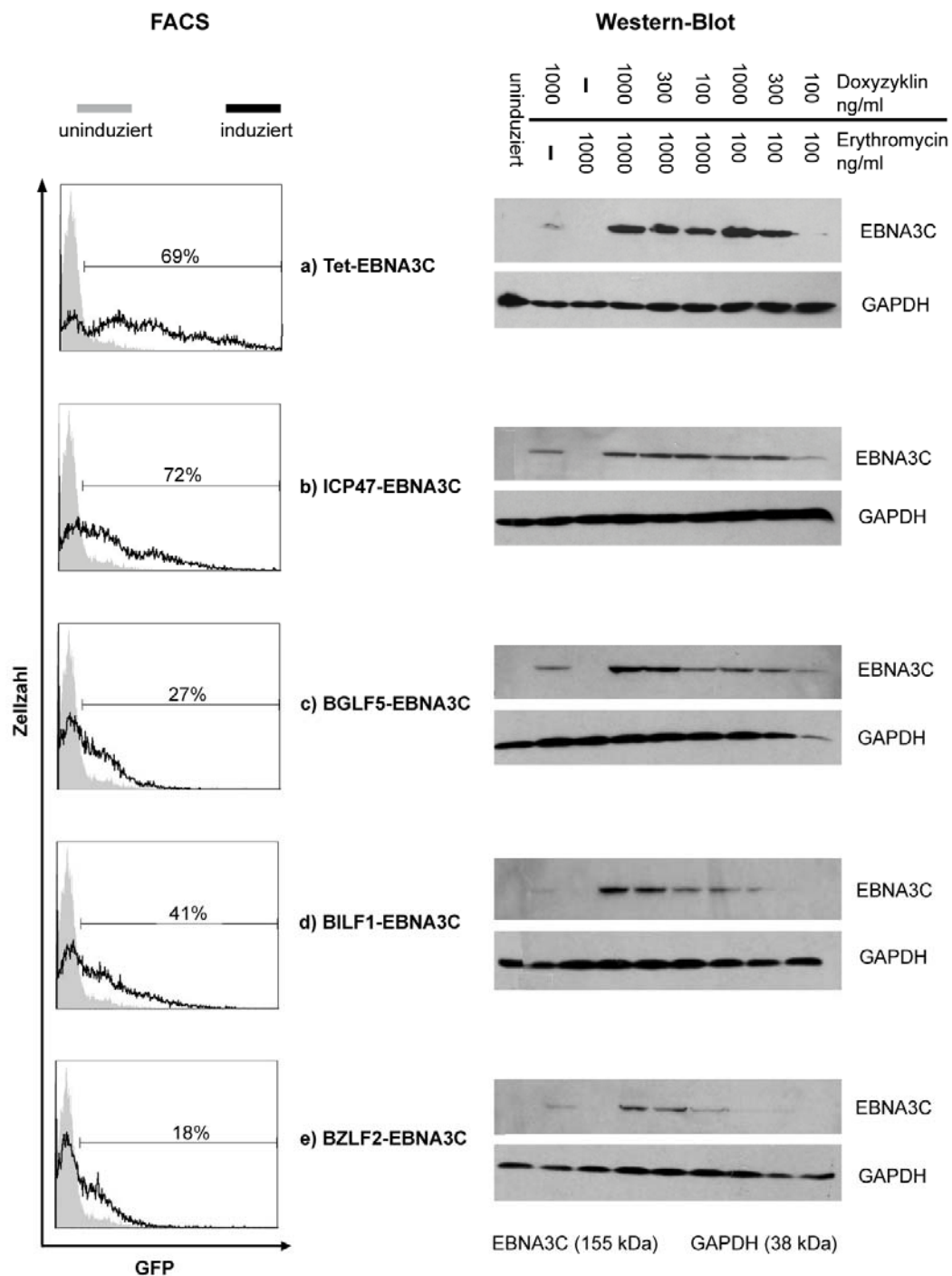


Abbildung 6.22: Nachweis der induzierbaren EBNA3C-Expression in den stabil transfizierten Zelllinien. Die mit den verschiedenen Expressionsplasmiden transfizierten Zellen der Linie LCL GB Ag wurden 24 h nach Zugabe von Doxyzyklin (1000 ng/ml) mittels FACS-Analyse auf deren Expression von *green fluorescent protein* (GFP) hin untersucht. Parallel dazu wurde die Expression von EBNA3C in Abhängigkeit von Doxyzyklin und Erythromycin überprüft. Hierfür wurden die Zelllinien für 36 h mit den angegebenen Doxyzyklin- und Erythromycin-Mengen behandelt. Der immunologische Nachweis des Antigens erfolgte im Western-Blot mit Hilfe eines EBNA3C-spezifischen Antikörpers und eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH. Abkürzung: HRP, *horseradish peroxidase*

Um den Einfluss der verschiedenen immunmodulatorischen Proteine auf die Präsentation des lytischen Antigens BZLF1 zu untersuchen, wurden folgenden Expressionsplasmide mittels Elektroporation in LCL GB W3 transfiziert. LCL GB W3 sind des Typs LCL Z(-) und exprimieren daher kein endogenes BZLF1.

Tabelle 6.3: BZLF1-Expressionsplasmide und die generierten LCL GB W3-Zelllinien

Plasmid	Bezeichnung der generierten Zelllinien
Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	GB W3/Tet-BZLF1
BGLF5-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	GB W3/BGLF5-BZLF1
BILF1-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	GB W3/BILF1-BZLF1
BNLF2a-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	GB W3/BNLF2a-BZLF1
BZLF2-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	GB W3/BZLF2-BZLF1
ICP47-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1	GB W3/ICP47-BZLF1

Der Prozentsatz an transfizierten Zellen wurde durchflusszytometrisch über die Messung des Anteils an grünfluoreszierenden Zellen nach Doxyzyklin-Behandlung bestimmt. Vermutlich aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienzen variierte der Anteil GFP-positiver Zellen initial zwischen den Zelllinien. Diese Unterschiede konnten in der Folge zumindest zum Teil durch wiederholte magnetische Zellsortierung ausgeglichen werden. Um die konditionale Expression von BZLF1 zu überprüfen, wurden die verschiedenen, stabil transfizierten Zelllinien mit unterschiedlichen Mengen an Doxyzyklin und Erythromycin für 36 h behandelt und die Zelllysate anschließend mittels Western-Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von GAPDH. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 6.23 dargestellt. In allen Zelllinien konnte das Modellantigen BZLF1 nachgewiesen werden, und die Expression erfolgte in Abhängigkeit von Doxyzyklin und Erythromycin.

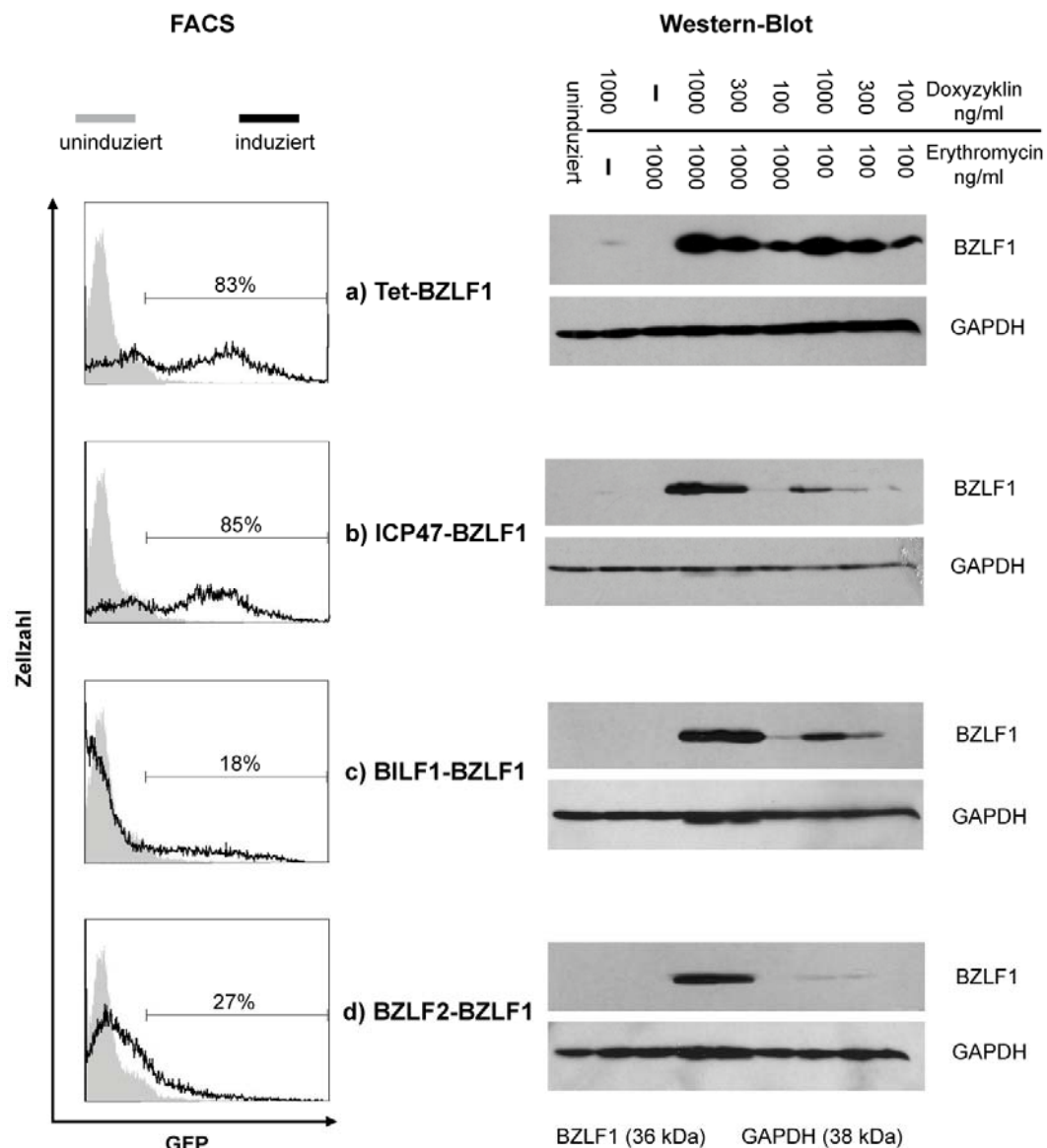


Abbildung 6.23: Nachweis der induzierbaren BZLF1-Expression in den stabil transfizierten LCL GB W3. Die mit den verschiedenen Expressionsplasmiden transfizierten Zellen der Linie LCL GB W3 wurden 24 h nach Zugabe von Doxyzyklin (1000 ng/ml) mittels FACS-Analyse auf deren GFP-Expression hin getestet. Parallel dazu wurde die Expression von BZLF1 in Abhängigkeit von Doxyzyklin und Erythromycin überprüft. Hierfür wurden die Zelllinien für 36 h mit den angegebenen Doxyzyklin- und Erythromycin-Mengen inkubiert. Der Nachweis von BZLF1 erfolgte mit Hilfe eines BZLF1-spezifischen Antikörpers und eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers im Western-Blot. Als Ladungskontrolle diente der Nachweis von GAPDH. Abkürzung: HRP, *horseradish peroxidase*

Für die Untersuchung der LMP2A-Präsentation in Ab- bzw. Anwesenheit der immunmodulatorischen Proteine wurden LCL 1.11 und LCL JM AgIII stabil mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Dadurch konnten bislang die in Tabelle 6.4 aufgelisteten Linien generiert werden.

Tabelle 6.4: LMP2A-Expressionsplasmide und die damit generierten LCL 1.11- bzw. JM AgIII-Transfektanten

Plasmid	Bezeichnung der generierten Zelllinien
Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A	LCL 1.11/- bzw. JM AgIII/Tet-LMP2A
BGLF5-Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A	JM AgIII/BGLF5-LMP2A
BILF1-Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A	LCL 1.11/- bzw. JM AgIII/BILF1-LMP2A
BNLF2a-Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A	JM AgIII/BNLF2a-LMP2A
BZLF2-Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A	LCL 1.11/- bzw. JM AgIII/BZLF2-LMP2A
ICP47-Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A	LCL 1.11/- bzw. JM AgIII/ICP47-LMP2A

Auch hier wurde der Prozentsatz an transfizierten Zellen in den verschiedenen LCL 1.11-Transfektanten anhand der Quantifizierung von GFP-positiven Zellen nach 24-stündiger Doxyzyklin-Behandlung (1000 ng/ml) im FACS ermittelt. Dabei wurden große Unterschiede in der Grünfluoreszenz der verschiedenen Transfektanten festgestellt (Abbildung 6.24). Eine Anreicherung von LCL 1.11, transfiziert mit dem Expressionsplasmiden BGLF5-Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A bzw. BNLF2a-Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A, war bislang nicht erfolgreich.

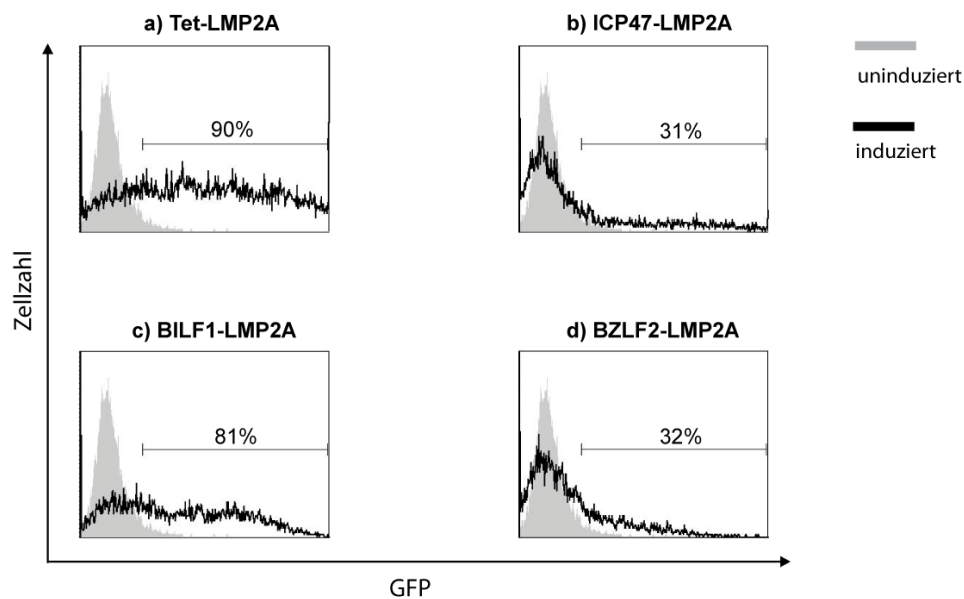


Abbildung 6.24: Bestimmung des Anteils an transfizierten Zellen in den generierten LCL 1.11-Transfektanten. Um den Anteil an transfizierten Zellen zu ermitteln, wurden die mit den verschiedenen Expressionsplasmiden transfizierten LCL 1.11-Zellen mit Doxyzyklin (1000 ng/ml) für 24 h behandelt und anschließend der Anteil an GFP-positiven Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert.

Da alle LCL LMP2A exprimieren, wurde die Induzierbarkeit der LMP2A-Expression in HEK293T-Zellen mittels Western-Blot verifiziert. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit dem Plasmid Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A transfiziert und die Expression von LMP2A durch Zugabe von jeweils 1000 ng/ml Doxyzyklin und Erythromycin für 36 h induziert. Als Negativkontrolle wurden transfizierte aber nicht-induzierte HEK293T-Zellen mitgeführt. Wie in Abbildung 6.25 zu sehen, wurde durch Zugabe von Doxyzyklin und Erythromycin die Expression des Transmembranproteins LMP2A induziert. Über den Nachweis von GAPDH wurde bestätigt, dass annähernd gleiche Proteinmengen geladen worden waren.

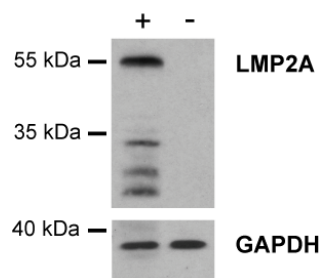


Abbildung 6.25: Doxyzyklin- und Erythromycin-abhängige Expression von LMP2A in HEK293T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden mit dem Vektor Tet-Ery-IRES-NGFR-LMP2A transfiziert und anschließend für 36 h mit 1000 ng/ml Doxyzyklin und 1000 ng/ml Erythromycin inkubiert (+). Parallel dazu wurden transfizierte Zellen unbehandelt weiterkultiviert (-). Anschließend wurden Proteinextrakte hergestellt und die Mengen an LMP2A bzw. GAPDH im Western-Blot mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper bestimmt. Neben intaktem, etwa 55 kDa großem LMP2A wurden auch kleinere Proteine detektiert, die vermutlich Degradationsprodukte darstellen. Der Nachweis von GAPDH diente als Kontrolle der geladenen Proteinmengen.

6.7.3 Nachweis der induzierbaren Expression der immunmodulatorischen Proteine BNLF2a und BGLF5 in HEK293T-Zellen

Die Induzierbarkeit der zwei immunmodulatorischen Proteine BNLF2a und BGLF5 wurde ebenfalls in HEK293T-Zellen überprüft. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit dem BNLF2a-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1- bzw. dem BGLF5-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1-Plasmid transfiziert. Nach Zusatz von 1000 ng/ml Doxyzyklin für 36 h wurden die Mengen an BNLF2a und BGLF5 mittels Western-Blot analysiert. Beide Proteine wurden in Abhängigkeit von Doxyzyklin in den transfizierten HEK293T-Zellen exprimiert (Abbildung 6.26).

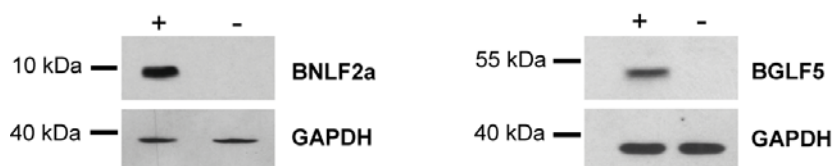


Abbildung 6.26: Doxyzyklinabhängige Expression von BNLF2a und BGLF5 in HEK293T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden mit dem Plasmid BNLF2a-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1 bzw. dem Plasmid BGLF5-Tet-Ery-Doxy-NGFR-BZLF1 transfiziert und danach für 36 h mit 1000 ng/ml Doxyzyklin behandelt (+), oder unbehandelt weiterkultiviert (-). Die Expression des BNLF2a- bzw. BGLF5-Proteins wurde mittels Western-Blot nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde auf derselben Membran das zelluläre Protein GAPDH nachgewiesen.

6.7.4 Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die Antigenpräsentation

Um den Einfluss der lytischen Proteine von EBV und des HSV-Proteins ICP47 auf die Präsentation der drei ausgewählten Modellantigene zu bestimmen, wurden T-Zellerkennungsversuche, wie in Abbildung 6.27 schematisch dargestellt, durchgeführt. Da die transfizierten Zellen nach Doxyzyklinzugabe die extrazelluläre Domäne des NGF-Rezeptors auf ihrer Oberfläche exprimierten, konnten diese durch magnetische Zellsortierung angereichert werden. Die Expression des immunmodulatorischen Genprodukts wurde durch Zugabe von Doxyzyklin und 12-24 h später die Expression des Modellantigens durch Zugabe von Erythromycin und erneuter Zugabe von Doxyzyklin induziert. Im Anschluss wurden die Zellen für weitere 48 h kultiviert und die Präsentation des Antigens durch Kokultur mit Antigen-spezifischen T-Zellen untersucht.

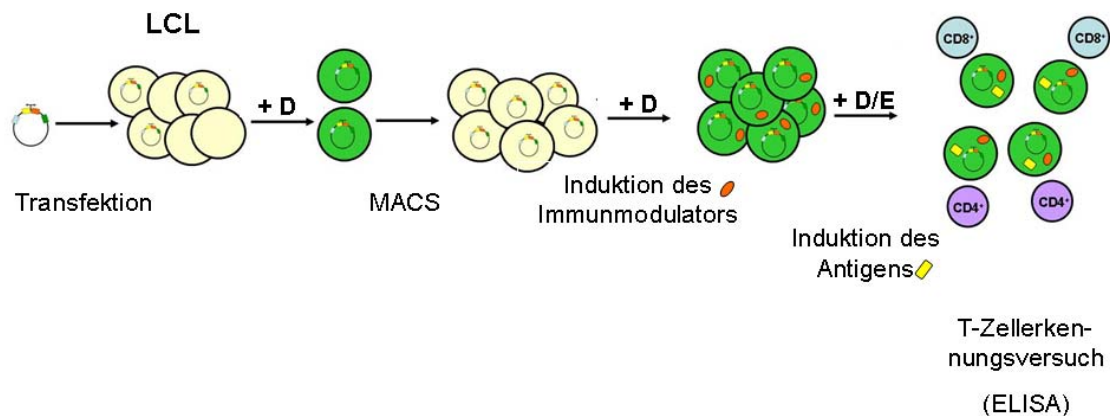


Abbildung 6.27: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Lymphoblastoide Zelllinien (LCL) wurden mit den verschiedenen Expressionsplasmiden (Abbildung 6.21) transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen durch magnetische Zellsortierung (MACS) angereichert. Die Expression der immunmodulatorischen Gene wurde durch Zugabe von Doxyzyklin (+ D) induziert. Nach 12-24 h wurde die Expression des Antigens durch Erythromycinzugabe (+ E) und erneuter Doxyzyklinzugabe (+D) induziert. Die MHC-I- bzw. MHC-II-restringierte T-Zellerkennung wurde durch Kokultur mit Antigen-spezifischen CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen überprüft. Die dabei freigesetzten Zytokine wurden im ELISA gemessen.

6.7.4.1 MHC-Klasse-II-restringierte Erkennung von EBNA3C in Abhängigkeit von EBV-Proteinen des lytischen Zyklus

Die Erkennung des Modellantigens EBNA3C in den stabil transfizierten LCL GB-Ag wurde durch Kokultivierung mit dem EBNA3C-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon GB EBNA3C-3H10 untersucht (Abbildung 6.28). Diese T-Zellen erkannten LCL GB Ag/Tet-EBNA3C-Zellen, die nur EBNA3C und kein immunmodulatorisches Genprodukt zusätzlich exprimieren, in Abhängigkeit von Doxyzyklin und Erythromycin. Eine CD4⁺ T-Zellerkennung des EBNA3C-Antigens wurde aber nicht nur in dieser Zelllinie, sondern auch in den vier anderen stabil transfizierten LCL GB Ag beobachtet. Da ICP47 und BILF1 die Präsentation von Antigenen auf MHC-I inhibieren, entsprach die EBNA3C-Erkennung in LCL GB Ag/ICP47-EBNA3C bzw. LCL GB Ag/BILF1-EBNA3C den Erwartungen. BGLF5 hingegen hemmt die Expression von MHC-II und dadurch die Präsentation von Antigenen an CD4⁺ T-Zellen (Rowe et al., 2007) und BZLF2 bindet direkt an MHC-II und interferiert dadurch sterisch mit der Antigenerkennung durch CD4⁺ T-Zellen (Ressing et al., 2003, Ressing et al., 2005). Somit wäre eine Abnahme der Antigenpräsentation in LCL GB Ag/BGLF5-EBNA3C und LCL GB Ag/BZLF2-EBNA3C erwartet worden. Ein inhibitorischer Effekt dieser Proteine auf die Präsentation von EBNA3C auf MHC-II konnte in diesem konditionalen Zellsystems jedoch nicht nachgewiesen werden.

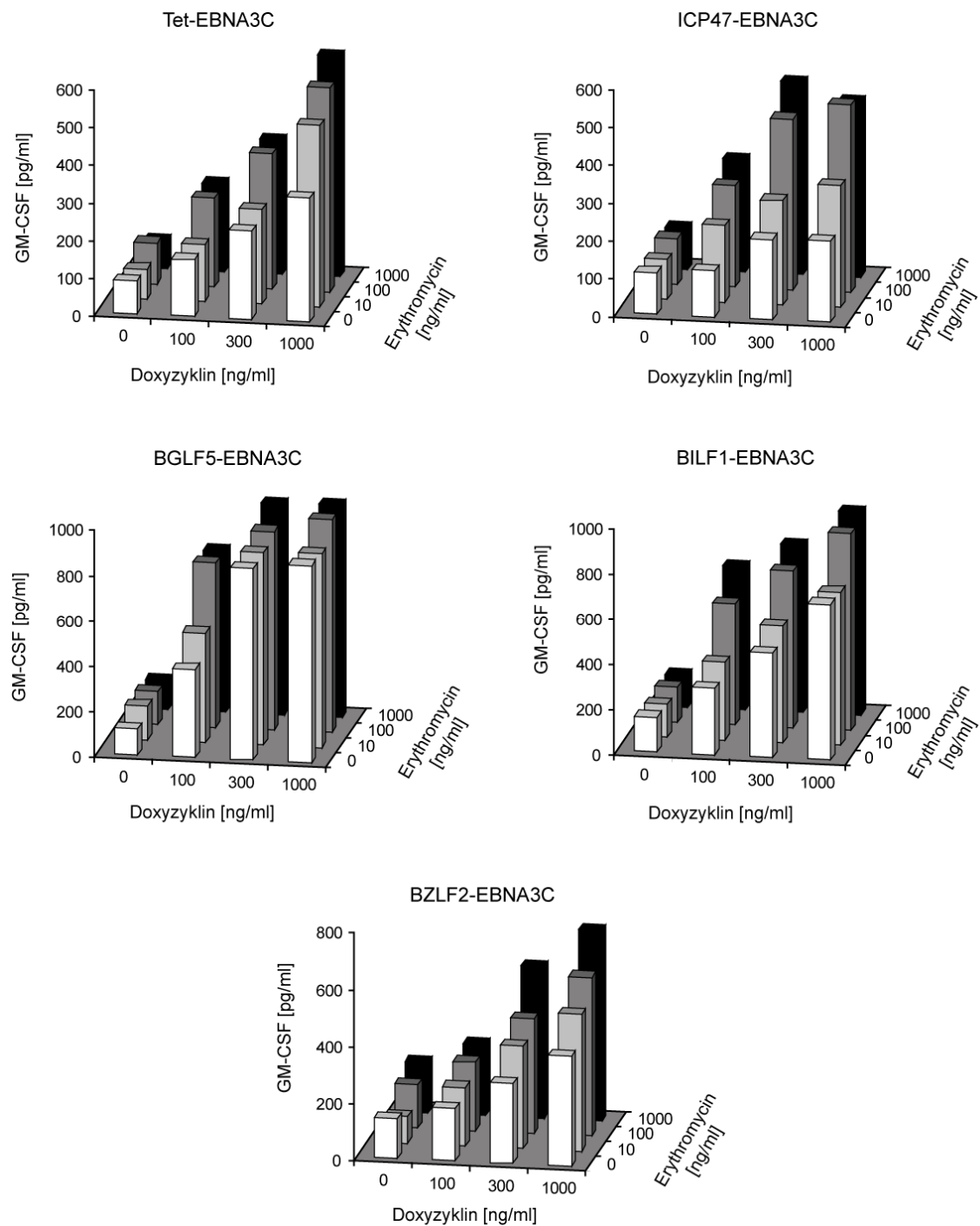


Abbildung 6.28: Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die CD4⁺ T-Zell-erkennung von EBNA3C. Um die Expression der immunmodulatorischen Proteine zu induzieren, wurden die generierten Zelllinien mit den angegebenen Mengen an Doxyzyklin behandelt. 12-24 h später wurde die Expression von EBNA3C durch Zugabe von steigenden Mengen an Erythromycin und Doxyzyklin induziert und für weitere 48 h kultiviert. Die MHC-II-restringierte Erkennung des Antigens wurde danach durch Kokultur mit dem EBNA3C-spezifischen CD4⁺ T-Zellklon GB EBNA3C-3H10 und anschließend GM-CSF-ELISA untersucht.

6.7.4.2 MHC-Klasse-I-restringierte Erkennung von BZLF1 in Abhängigkeit von immunmodulatorischen Proteinen

Der Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die MHC-I-assoziierte Antigenpräsentation wurde anhand der stabil transfizierten LCL GB W3 Zelllinien untersucht. Auch hier wurde zuerst die Expression der immunmodulatorischen Genprodukte induziert und 12 bis 24 h später die Expression des Antigens BZLF1 angeschaltet. Nach weiteren 36 bis 48 h wurde durch Kokultur der induzierten Zellen mit BZLF1-spezifischen CD8⁺ T-Zellen der Einfluss der viralen Proteine auf die Antigenpräsentation untersucht. Mit steigenden Mengen an Doxzyklin und Erythromycin wurde eine zunehmende CD8⁺ T-Zellerkennung der LCL GB W3/Tet-BZLF1 beobachtet (Abbildung 6.29). In Anwesenheit des HSV-Proteins ICP47 wurde dagegen keine BZLF1-Erkennung detektiert. Dies entsprach den Erwartungen, da ICP47 die Funktion von TAP blockiert und dadurch die Peptid-Beladung von MHC-I und somit die Präsentation von Antigenen sehr effizient hemmt (Fruh et al., 1995, Hill et al., 1995). Für das im lytischen Zyklus exprimierte Protein BILF1 war vorbeschrieben, dass es den lysosomalen Abbau von MHC-I förderte (Zuo et al., 2009). In dem konditionalen Zellsystem konnte dieser inhibitorische Effekt von BILF1 auf die Antigenpräsentation ebenfalls beobachtet werden. Im Gegensatz zu ICP47 wurde die Präsentation allerdings nicht vollständig gehemmt. Dagegen hatte die Expression von BGLF5 keinen Einfluss auf die Präsentation des Antigens. Somit scheint BGLF5 weder die Präsentation von Antigenen auf MHC-I noch auf MHC-II zu inhibieren. Auch BZLF2 beeinträchtigte die CD8⁺ T-Zellerkennung nicht, was aufgrund der Tatsache, dass BZLF2 die Antigenpräsentation über den MHC-I-Antigenpräsentationsweg nicht beeinflusst, nicht unerwartet war.

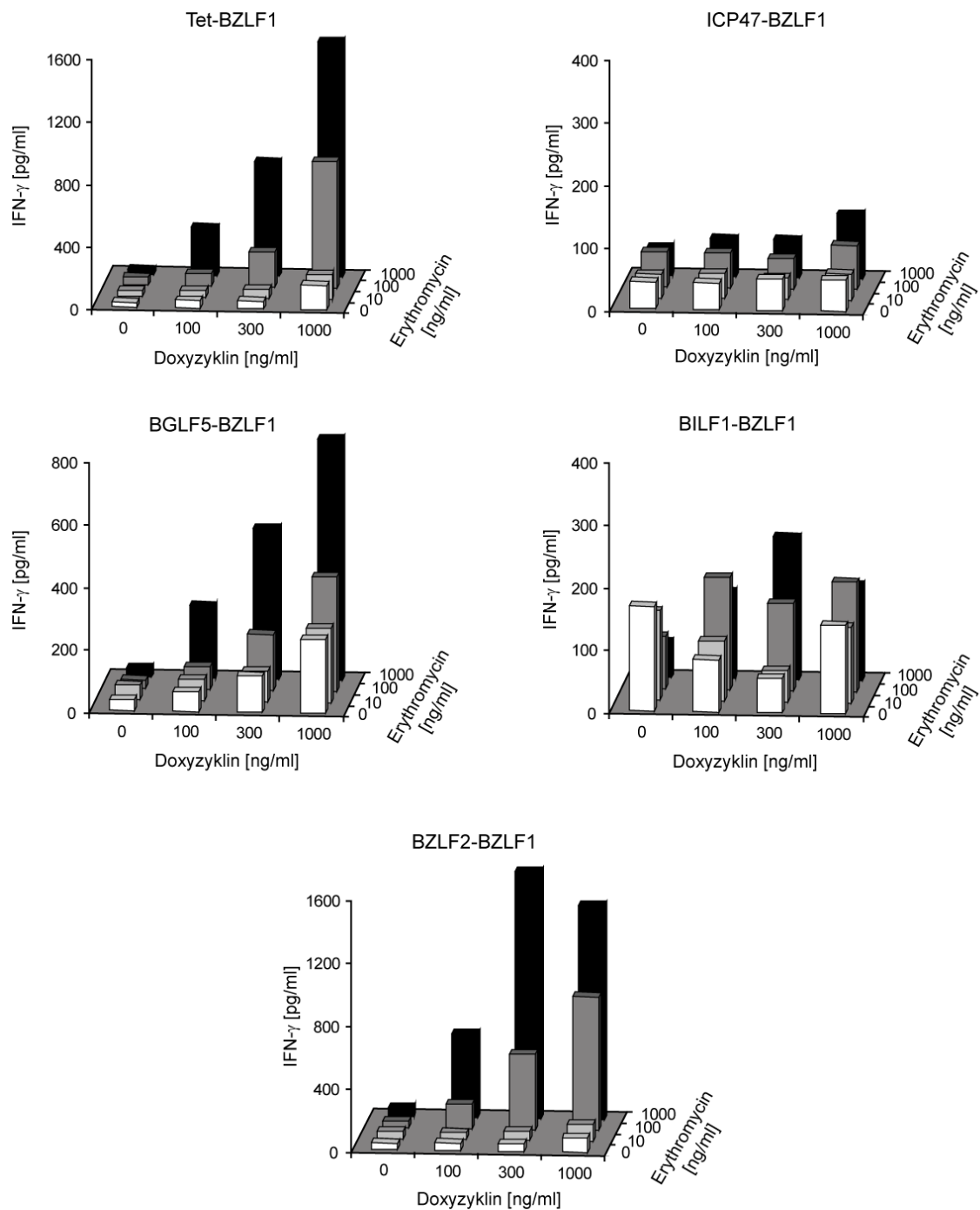


Abbildung 6.29: Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die CD8⁺ T-Zell-erkennung von BZLF1. Der Einfluss der Proteine ICP47, BGLF5, BILF1 und BZLF2 auf die Präsentation von BZLF1 auf MHC-I wurde anhand der in Tabelle 6.3 aufgeführten Transfektanten untersucht. Die Expression der immunregulatorischen Proteine wurde durch Zugabe der angegebenen Mengen an Doxyzyklin induziert. Nach 12-24 Stunden wurde die Expression des Antigens BZLF1 durch Zugabe von Erythromycin und Doxyzyklin angeschaltet. Die MHC-I-restringierte Antigenpräsentation wurde durch Kokultur mit der BZLF1-spezifischen CD8⁺ T-Zelllinie Lg und anschließend IFN γ -ELISA gemessen.

6.7.4.3 MHC-Klasse-I-restringierte Erkennung von LMP2A in Abhängigkeit von immunmodulatorischen Proteinen

Das virale Membranproteins LMP2A wurde in diese Untersuchungen mit einbezogen, da in zwei Arbeiten beschrieben worden war, dass LMP2A über einen TAP-unabhängigen Prozess auf MHC-I beladen wurde (Khanna et al., 1996, Lee et al., 1996). Somit sollte das HSV-Protein ICP47 die Präsentation von LMP2A nicht negativ beeinflussen. Inwieweit die immunmodulatorischen Proteine von EBV diesen Antigenpräsentationsweg inhibieren, war noch unbekannt. In Abwesenheit immunmodulatorischer Proteine erkannten die LMP2A-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (JM-CD8) die Zielzellen in einer Doxyzyklin- und Erythromycin-abhängigen Weise (Abbildung 6.30).

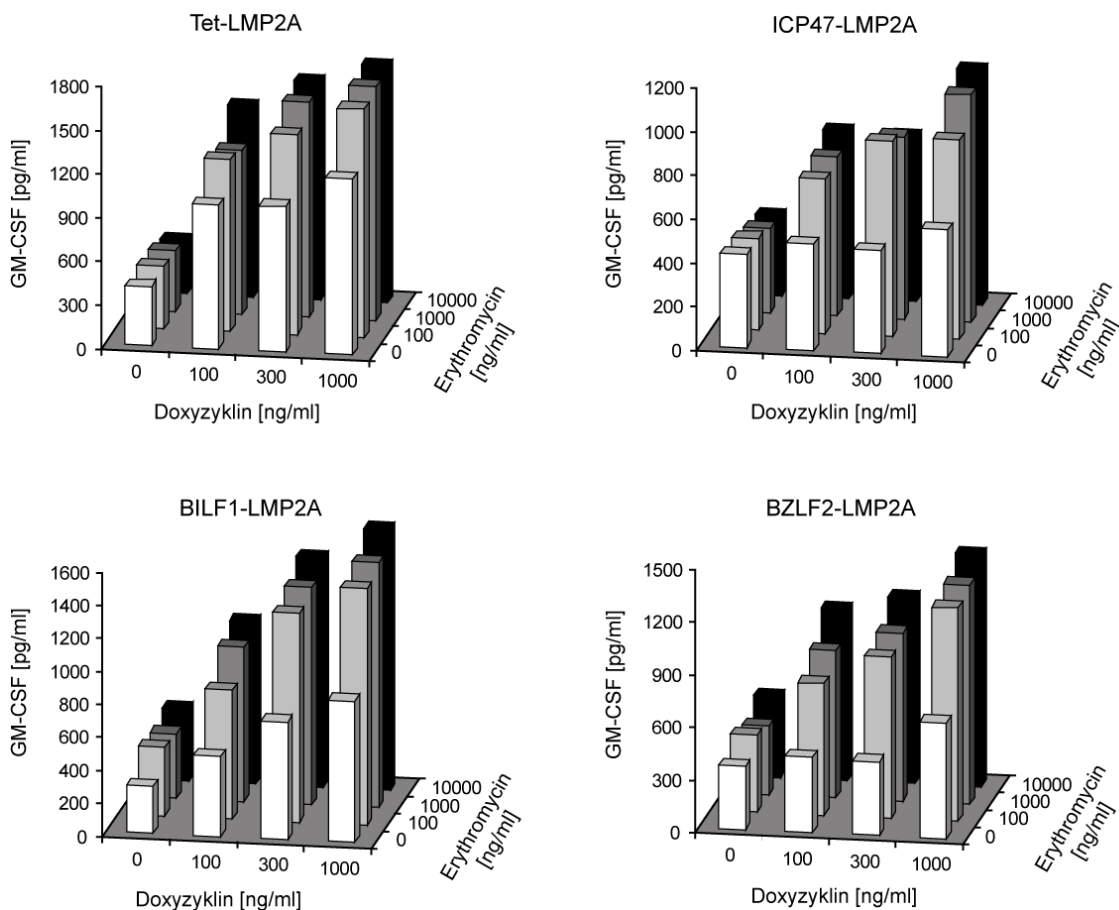


Abbildung 6.30: Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die CD8⁺ T-Zellerkennung von LMP2A. Die Expression der immunmodulatorischen Proteine ICP47, BILF1 und BZLF2 in den in Tabelle 6.4 aufgeführten Transfektanten wurde durch Zugabe der angegebenen Mengen an Doxyzyklin induziert. 12-24 h später wurde die Expression des Antigens LMP2A durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an Erythromycin und Doxyzyklin angeschaltet. Die MHC-I-restringierte Erkennung von LMP2A wurde durch Kokultur mit der LMP2A-spezifischen CD8⁺ T-Zelllinie JM-CD8 und anschließend IFN γ -ELISA ermittelt.

Die Anwesenheit von ICP47 in diesen Zellen beeinträchtigte die CD8⁺ T-Zellerkennung nicht signifikant. Aufgrund der schon vorher gezeigten, effizienten Hemmung der CD8⁺ T-Zellerkennung durch ICP47, sprachen diese Ergebnisse tatsächlich für einen TAP-unabhängigen Präsentationsweg. Dieser Präsentationsweg scheint auch nicht durch BILF1 gehemmt zu werden, da die CD8⁺ T-Zellerkennung auch in Anwesenheit dieses immunmodulatorischen Proteins nicht beeinträchtigt war. Den Erwartungen entsprechend hatte die Expression von BZLF2 keinen Einfluss auf die MHC-I-restringierte Erkennung von LMP2A.

Aufgrund der Erkennung von endogenen LMP2A in den stabil transfizierten LCL wurden bereits im nicht-induzierten Zustand relativ hohe Mengen an GM-CSF gemessen. Deshalb wurde neben GM-CSF auch die IL-4-Ausschüttung der T-Zellen im ELISA bestimmt (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche ergaben das gleiche Erkennungsmuster wie in Abbildung 6.30 dargestellt. Zudem wurde die MHC-I-restringierte Erkennung von LMP2A in Anwesenheit der immunmodulatorischen Genprodukte in einer weiteren Zelllinie untersucht. Hierfür wurde die LCL JM AgIII mit den beschriebenen Expressionsplasmiden stabil transfiziert (Tabelle 6.4). Die vorläufigen Ergebnisse sind in der Abbildung 6.31 dargestellt. In Abwesenheit immunmodulatorischer Genprodukte wurde eine Doxzyklin- und Erythromycin-abhängige CD8⁺ T-Zellerkennung detektiert. Erwartungsgemäß wurde keine Hemmung der LMP2A Präsentation durch BZLF2 beobachtet. Auch die immunmodulatorischen Proteine ICP47 und BILF1 hatten erneut keinen Einfluss auf die Präsentation von LMP2A. Dagegen führte die Expression von BGLF5 zu einer stark verminderten Antigenpräsentation. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass LMP2A in der Tat durch einen TAP-unabhängigen Prozess in das ER-Lumen gelangte und dort auf MHC-I geladen wurde, und dass womöglich BILF1 und BGLF5 nur bestimmte MHC-I bzw. mRNA-Moleküle spezifisch degradieren.

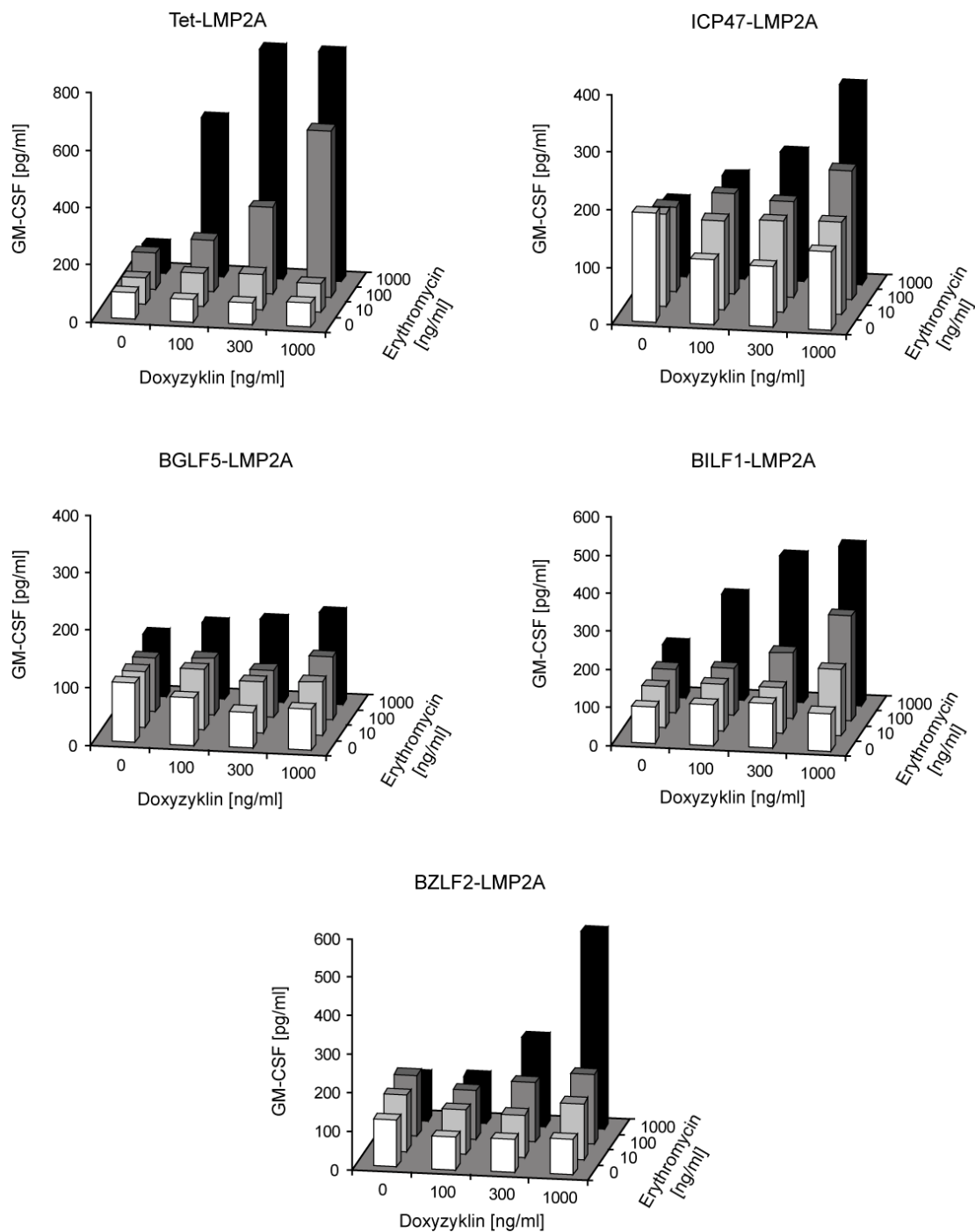


Abbildung 6.31: Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die CD8⁺ T-Zell-erkennung von LMP2A. Die Expression der immunmodulatorischen Proteine ICP47, BGLF5, BILF1 und BZLF2 in den in Tabelle 6.4 aufgeführten Transfektanten wurde durch Zugabe der angegebenen Mengen an Doxyzyklin induziert. 12-24 h später wurde die Expression des Antigens LMP2A durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an Erythromycin und Doxyzyklin angeschaltet. Die MHC-I-restringierte Erkennung von LMP2A wurde durch Kokultur mit der LMP2A-spezifischen CD8⁺ T-Zelllinie JM-CD8 und anschließend IFN γ -ELISA ermittelt.

7 Diskussion

EBV-spezifische CD4⁺ T-Zellen tragen zur Kontrolle der EBV-Infektion bei, indem sie neu-infizierte B-Zellen eliminieren und somit das Auswachsen von EBV-immortalisierten B-Zellen hemmen (Adhikary et al., 2006). Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob EBV-spezifische CD4⁺ T-Zellen darüber hinaus auch lytisch infizierte B-Zellen erkennen und eliminieren können, bevor Virusnachkommen freigesetzt werden, oder ob lytische Genprodukte von EBV mit der CD4⁺ T-Zellerkennung interferieren.

7.1 Die CD4⁺ T-Zellerkennung von lytisch EBV-infizierten B-Zellen

Voraussetzung für die Analyse der MHC-II-restringierten T-Zellerkennung von lytisch EBV-infizierten B-Zellen war die Etablierung eines Zellsystems, in dem der lytische Zyklus von EBV kontrolliert induziert werden konnte. Da aus bislang unbekannten Gründen große Unterschiede in der Reaktivierbarkeit von EBV in verschiedenen EBV-immortalisierten Zelllinien bestehen, wurde zunächst mit Hilfe chemischer Induktoren getestet, welche der im Labor geführten Zelllinien sich potentiell für die gezielte Induktion des lytischen Zyklus eignen.

7.1.1 Induktion des lytischen Zyklus von EBV in LCL und BL-Zelllinien durch verschiedene Agenzien

Obwohl von mehreren Substanzen beschrieben wurde, dass sie den lytischen Zyklus von EBV in B-Zellen induzieren, hatten nicht alle getesteten Agenzien das gleiche Potential, den Übergang von der Latenz in die lytische Phase einzuleiten. In allen drei getesteten LCL ließ sich der lytische Zyklus von EBV nur durch TPA-Behandlung induzieren. Dagegen führte die Behandlung der LCL mit Natriumbutyrat, VPA, oder DMSO nicht zur Virusproduktion (Abbildung 6.1). Da TPA jedoch T-Zellen unspezifisch aktiviert, war eine zeitabhängige Untersuchung der T-Zellerkennung von lytisch infizierten Zellen nach TPA-Behandlung nicht möglich. Daher sollte der lytische Zyklus von EBV durch die konditionale Expression von BZLF1 in LCL induziert werden. Hierfür wurden LCL der Spender GB und JM verwendet, bei denen nach TPA-Behandlung eine hohe Virusfreisetzung gemessen wurde und in denen somit der lytische Zyklus induziert werden konnte.

7.1.2 Etablierung eines konditionalen Zellsystems, welches die lytische Reaktivierung von EBV ermöglicht

In diesen Zelllinien wurde untersucht, ob die lytische Replikation von EBV durch die gezielte Expression von BZLF1 aktiviert werden konnte. Zu diesem Zweck wurden LCL mit einem Expressionsvektor transfiziert, der eine Induktion der BZLF1-Expression über die Zugabe von Doxyzyklin zum Kulturmedium erlaubte. Da LCL im Allgemeinen eine sehr niedrige Transfektionseffizienz aufweisen, mussten stabil transfizierte Zelllinien etabliert werden. Eine Klonierung der transfizierten Zellpopulationen war aufgrund des Zelldichte-abhängigen Wachstums der LCL nicht zielführend. Auch eine Anreicherung transfizierter Zellen mittels gängiger, Antibiotika-basierter Selektionsmarker war aus diesem Grund problematisch. Deshalb wurden Vektoren erstellt, die zusätzlich zu BZLF1 eine Doxyzyklin-abhängige Expression von NGFR und damit eine Anreicherung der transfizierten Zellen mittels magnetischer Sortierung ermöglichten. Diese Strategie barg jedoch die Gefahr, dass es durch die gleichzeitige Induktion der BZLF1-Expression und der dadurch womöglich ausgelösten lytischen Replikation nicht zu einer Anreicherung, sondern zu einem Verlust der transfizierten Zellen kam. Deshalb wurden zwei weitere Vektoren erstellt und getestet, die eine unabhängige Expression von NGFR und BZLF1 ermöglichten. Wie sich im Nachhinein herausstellte, hatte die gleichzeitige Expression von NGFR und BZLF1 bei der Etablierung der stabilen Zelllinie keinen nachteiligen Effekt. Lediglich bei sehr langer Kultivierung der BZLF1-Transfektanten konnte durch die ungekoppelte Regulation der NGFR-Expression eine etwas bessere Zellanreicherung mittels MACS erzielt werden.

Der lytische Zyklus von EBV konnte sowohl in LCL GB/Tet-BZLF1 als auch in LCL GB/Ery-BZLF1, nicht aber in LCL GB/Tet-BZLF1-TxER induziert werden. Dies war erstaunlich, da in allen drei Linien eine Expression des BZLF1-Proteins bzw. BZLF1-Östrogenrezeptor-Fusionsproteins nachgewiesen werden konnte (Abbildungen 6.4-6.6). Eine mögliche Erklärung lag darin, dass das BZLF1-Fusionsprotein eventuell auch in Anwesenheit von Tamoxifen im Zytoplasma zurückgehalten wurde. Gegen diese Hypothese sprachen jedoch Untersuchungen mit einem zusätzlich mit GFP-gekoppelten Fusionsprotein in HEK293-Zellen, in denen das Fusionsprotein nach Tamoxifenzugabe rasch in den Zellkern wanderte (Daten nicht gezeigt). Alternativ war denkbar, dass die Fusion mit der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors dazu geführt hatte, dass BZLF1 nicht mehr seine transaktivierende Funktion ausüben konnte. BZLF1 gehört zu der Familie der bZIP-Transkriptionsfaktoren (Chang et al., 1990). Die carboxyterminale *Leucin-Zipper*-Domäne ist dabei essentiell für die Dimerisierung

von BZLF1 und für die Bindung des Homodimers an die DNA (Flemington and Speck, 1990). Womöglich wurde durch die Fusion der Östrogenbindedomäne an das carboxyterminale Ende von BZLF1 die korrekte Bildung des Homodimers oder die sequenzspezifische Bindung an die DNA gehemmt. Durch den Nachweis von BZLF1-induzierten Proteinen mittels Western-Blot soll in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden, ob das BZLF1-Fusionsprotein seine physiologische Funktion als Transkriptionsaktivator noch ausüben kann.

Aufgrund einer vorangegangenen Beobachtung der Arbeitsgruppe, dass die spontane Virusfreisetzung aus LCL über die Zeit stark variieren kann (Adhikary et al., 2008), wurden LCL Z(-) für die Analyse der T-Zellerkennung herangezogen. Da LCL Z(-) aufgrund des Fehlens von BZLF1 keine lytischen Genprodukte exprimieren, sollten diese Zellen eine genaue Untersuchung der T-Zellerkennung lytisch infizierter Zellen unabhängig von einer spontanen Virusproduktion ermöglichen. Wegen des Fehlens von BZLF1 konnte allerdings in diesen Zellen die Induzierbarkeit des lytischen Zyklus von EBV mittels TPA nicht vorab getestet werden. Deshalb wurden mehrere LCL Z(-) von verschiedenen Spendern mit einem BZLF1-Expressionsplasmid transfiziert und getestet. Dabei konnte in vier von 13 BZLF1-transfizierten LCL Z(-) der lytische Zyklus von EBV induziert werden (Abbildung 6.11). Dies entspricht erfahrungsgemäß in etwa dem Prozentsatz an LCL, die spontan nachweisbare Mengen an Virus freisetzen. Die Induzierbarkeit des lytischen Zyklus scheint demnach vom Zellhintergrund, aber nicht vom verwendeten Virus abzuhängen.

7.1.3 Die Induktion des lytischen Zyklus löst die kaskadenartige Expression lytischer EBV-Genprodukte aus

Nach Induktion des lytischen Zyklus von EBV erfolgt eine sequentielle Anschaltung von lytischen Genen, die nach der zeitlichen Reihenfolge ihrer Expression als sehr frühe, frühe und späte Gene bezeichnet werden (Kieff and Rickinson, 2006). In den transfizierten Zelllinien konnte die kaskadenartige Expression der sehr frühen lytischen Genprodukte BZLF1 und BRLF1 sowie des frühen lytischen Proteins BMRF1, welches direkt durch die Transkriptionsfaktoren BZLF1 und BRLF1 aktiviert wird, nachgewiesen werden (Abbildung 6.7 bzw. Abbildung 6.12). Allerdings wurden diese Genprodukte in verschiedenen Zelllinien nicht immer zum selben Zeitpunkt nach Doxyzyklinzugabe detektiert, was womöglich auf eine unterschiedliche Kinetik der Genexpression in verschiedenen Zelllinien hinwies. Diese Unterschiede basierten aber wohl eher auf unterschiedlich hohen Anteilen an transfizierten Zellen, bzw. auf einem unterschiedlich ho-

hen BZLF1-Expressionsniveau, das mit zunehmender Kulturdauer vermutlich aufgrund zunehmender Methylierung des Tet-Promotors kontinuierlich abnahm. Denn wurden die Western-Blot-Analysen kurz nach Generierung der Transfektanten durchgeführt, so konnte die Expression der Genprodukte in der Regel früher detektiert werden als nach längerer Kulturdauer (Daten nicht gezeigt).

7.1.4 Nicht jede lytisch EBV-infizierte Zelle setzt infektiöse Viren frei

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der lytische Zyklus von EBV in LCL und LCL Z(-) durch konditionale BZLF1-Expression induziert werden kann. In der Mehrzahl der stabil transfizierten Zelllinien kam es allerdings nicht zur Synthese von neuen, infektiösen Viruspartikeln (Abbildung 6.11), obwohl auf Proteinebene nicht nur BZLF1, sondern auch das zweite sehr frühe Protein BRLF1, sowie das frühe Antigen BMRF1 nachgewiesen werden konnten (Abbildung 6.13). Somit musste es zu einem Stopp der lytischen Kaskade unterhalb der BMRF1-Expression gekommen sein. Bislang wurden zwei Kontrollpunkte identifiziert, die über die lytische Reaktivierung von EBV entscheiden: die Induktion der BZLF1-Expression und die Aktivierung von Zielgenen des BZLF1.

In der Latenz unterliegt die Expression von BZLF1 einer strikten Kontrolle durch virale und zelluläre Faktoren. Der Eintritt in die lytische Phase wird durch das virale Protein LMP2A und durch das zelluläre Protein ZEB1 (*zinc finger E-box binding factor 1*) reguliert. Das latente Membranprotein LMP2A hat vermutlich eine duale Rolle bei der EBV-Infektion: in Anwesenheit eines BCR-Signals hemmt LMP2A die Induktion des lytischen Zyklus in EBV-infizierten Zellen, wohingegen es in Abwesenheit solcher Stimuli die Virusreaktivierung induziert. Dabei ahmte LMP2A in den unstimulierten Zellen Signale des aktivierten BCR nach und aktivierte so die BZLF1-Expression (Schaadt et al., 2005).

ZEB1 bindet mit Hilfe seiner zwei Zinkfinger-Domänen an zwei DNA-Elemente (ZV und ZV') im BZLF1-Promotor und inhibiert so die BZLF1-Expression und dadurch die Induktion des lytischen Zyklus (Kraus et al., 2001, Kraus et al., 2003, Yu et al., 2007). Neuere Daten weisen zudem darauf hin, dass in manchen Zellen auch ZEB2, das zweite Mitglied dieser Proteinfamilie, die Induktion des lytischen Zyklus hemmen kann (Ellis et al., 2010). Beide Proteine, ZEB1 und ZEB2, werden von verschiedenen Zellen unterschiedlich hoch exprimiert (Ellis et al., 2010). Da in der vorliegenden Arbeit die BZLF1-Transkription durch den Tet-Promotor kontrolliert wurde, konnten ZEB1 und ZEB2 als

Grund für die fehlende EBV-Reaktivierung ausgeschlossen werden. Ob die Zielsequenzen von ZEB1 oder ZEB2 noch in anderen viralen Promotoren vorkommen, und ob dadurch möglicherweise die Expression später lytischer Proteine gehemmt wird, ist bislang unbekannt. Ein Zusammenhang zwischen niedrigen ZEB1-Proteinmengen und verstärkter Virusfreisetzung konnten jedoch in einem ersten Experiment nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Darüber hinaus wird die Induktion des lytischen Zyklus durch epigenetische Modifikationen beeinflusst. Diese Annahme basiert auf Untersuchungen die zeigten, dass durch Behandlung mancher Zellen mit HDAC-Inhibitoren (Luka et al., 1979, Yoshida et al., 1990), oder mit einem Inhibitor der Methyltransferase (5-Azacytidin) der lytische Zyklus induziert werden kann (Ben-Sasson and Klein, 1981).

Die CpG-Methylierung von Promotoren dient in der Regel dazu, die Genexpression zu unterdrücken. Im Fall von BZLF1 konnte allerdings gezeigt werden, dass BZLF1 an bestimmte Promotoren nur dann binden kann, wenn diese in methylierter Form vorliegen (Bhende et al., 2004, Bhende et al., 2005). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnte gezeigt werden, dass unmittelbar nach Infektion von B-Zellen zwar BZLF1 exprimiert wird, die fehlende Methylierung der viralen DNA den Eintritt in den lytischen Zyklus aber verhindert (Kalla et al., 2010). Dieser Prozess wird auch als abortiver lytische Zyklus bezeichnet und ist vermutlich für die Etablierung der latenten Infektion in B-Zellen notwendig. Während das EBV-Genom im Viruskapsid unmethyliert vorliegt, wird es in der Wirtszelle zunehmend methyliert, so dass bereits wenige Wochen nach Infektion der Methylierungsgrad des viralen Genoms soweit zugenommen hat, dass der lytische Zyklus vollständig durchlaufen werden kann (Kalla et al., 2010). Da die Etablierung und das Auswachsen von LCL bzw. LCL Z (-) bereits mehrere Wochen beansprucht, ist es unwahrscheinlich, dass das virale Genom in den in dieser Arbeit verwendeten LCL oder LCL Z(-) noch nicht vollständig methyliert war und es deshalb zu keiner Virusproduktion kam. Dagegen spricht auch, dass die Induzierbarkeit des lytischen Zyklus in LCL mit der Länge der Kulturdauer abnahm.

Die fehlende Virusproduktion in einigen stabilen Transfektanten trotz hoher BZLF1-Expression und der Aktivierung von BZLF1-Zielgenen spricht für einen weiteren, bisher unbekannten Kontrollpunkt im lytischen Zyklus von EBV. Zwei Beobachtungen weisen darauf hin, dass auch hierfür epigenetische Faktoren eine entscheidende Rolle spielen; zum einen die bereits beschriebenen Schwankungen in der spontanen Virusproduktion innerhalb einer Zelllinie über die Zeit (Adhikary et al., 2008), zum anderen die abneh-

mende Induzierbarkeit des lytischen Zyklus in LCL, die über längere Zeit kultiviert worden waren. So kam es nach Induktion der BZLF1-Expression in der Zelllinie LCL Z(-) JM-II/Tet-BZLF1 zur Virusproduktion, in der LCL Z(-) JM/Tet-BZLF1 „alt“ jedoch nicht, obwohl es sich um die gleiche Ausgangszelllinie handelte. Dafür, dass die Induzierbarkeit des lytischen Zyklus von EBV in LCL mit der Kulturdauer abnimmt, sprachen auch Beobachtungen von Kenney et al. (2007), die zeigten, dass in lange kultivierten LCL eine Reaktivierung von EBV mittels verschiedener Induktoren schwerer herbeigeführt werden kann, als bei neu angelegten LCL.

Momentan sind weder die verantwortlichen Faktoren noch der Zeitpunkt bekannt, zu dem es in den untersuchten Zellen zum Abbruch des lytischen Zyklus kommt. Um den Zeitpunkt einzugrenzen, soll in zukünftigen Western-Blot- und quantitativen PCR-Analysen die Expression weiterer früher und später lytischer Gene untersucht werden. Mit Hilfe von Gardella-Gelen, die eine Differenzierung zwischen linearer, zirkulärer und in das Wirtsgenom integrierter EBV-DNA ermöglichen (Gardella et al., 1984), soll darüber hinaus untersucht werden, ob in diesen Zelllinien die Replikation der viralen DNA beeinträchtigt ist. Da nur während der lytischen Replikation das virale Genom als lineare DNA vorliegt, und die Expression der späten Gene erst nach DNA Replikation stattfindet, würde der Nachweis von ausschließlich zirkulärer oder integrierter DNA auf einen Abbruch des lytischen Zyklus bereits während der Expression früher lytischer Gene hinweisen.

Möglicherweise ist die fehlende Virusproduktion auch Folge von zellulären Abwehrstrategien. So könnte beispielsweise in abortiv lytisch infizierten Zellen vermehrt Apoptose induziert und deshalb keine Virusnachkommen produziert werden. Diese Hypothese soll durch den Vergleich der Apoptoserate in produktiv und nicht-produktiv lytisch infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach BZLF1-Expression überprüft werden.

7.1.5 Lytisch infizierte LCL werden erst nach Virusfreisetzung von EBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen erkannt

Mit Hilfe der konditionalen Zelllinien wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob lytisch infizierte B-Zellen von EBV-spezifischen T-Zellen erkannt werden. Um zunächst den Zeitpunkt der Virusfreisetzung zu bestimmen, wurden Kulturüberstand-Transfer-Experimente durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass 20 bis 24 h nach BZLF1-Induktion die Virusfreisetzung begann und über die nächsten Tage weiter zu-

nahm. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass neu-synthetisierte Viren kontinuierlich freigesetzt werden, dass womöglich nicht in jeder Zelle der lytische Zyklus gleich lang dauert, und dass lytisch infizierte Zellen erst nach mehreren Tagen in Apoptose gehen. Letzteres steht im Einklang mit den Beobachtungen von Rensing et al. (2005), die zeigen, dass lytisch infizierte Zellen bis zu fünf Tage überleben, bevor es zur Zelllyse kommt.

Anfangs durchgeführte $CD4^+$ T-Zellexperimente ergaben, dass lytisch infizierte LCL bereits wenige Stunden nach Induktion der BZLF1-Expression und noch vor Beginn der Virusfreisetzung erkannt wurden. Diese Interpretation war jedoch problematisch, da die Antigenpräsentation auch noch während der 16 bis 20-stündigen Kokultur mit den T-Zellen erfolgte, und dadurch der genaue Zeitpunkt der T-Zellerkennung nicht präzise definiert werden konnte. Tatsächlich fand die Zytokinausschüttung der im eigenen Labor geführten T-Zellen bereits 2 Stunden nach Antigenerkennung statt. Ein danach durchgeführtes T-Zellexperiment mit verkürzter Kokultur von lytisch infizierten Zellen und T-Zellen ergab eine $CD4^+$ T-Zellerkennung des späten lytischen Antigens BLLF1 erst nach Virusfreisetzung (Abbildung 6.17). Auch PFA-fixierte Zellen wurden erst nach Virusfreisetzung von EBV-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen erkannt. Die als Kontrolle mitgeführten EBV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen konnten dagegen lytisch infizierte Zellen erkennen, bevor Viren freigesetzt wurden (Abbildung 6.18).

Für die fehlende Erkennung lytisch infizierter B-Zellen durch Virus-spezifische $CD4^+$ T-Zellen kommen mehrere Ursachen in Frage.

Dass lytische Genprodukte nicht über einen endogenen, sondern nur über den exogenen Präsentationsweg auf MHC-II geladen werden können, wurde durch eigene (Abbildung 6.19) wie auch Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe ausgeschlossen (Lee et al., 1993).

Daneben könnte die Nutzung des zellulären Vesikeltransports für die Ausschleusung von Viruspartikeln zu einem verminderten Nachschub an MHC-II an die Zelloberfläche und dadurch zu einer verminderten Antigenpräsentation führen. Inwieweit der Prozess der Virusreifung mit dem Transport von MHC-II oder auch von MHC-I interferiert, ist bislang noch nicht untersucht.

Darüber hinaus könnten immunregulatorische Proteine von EBV mit der Antigenpräsentation interferieren und damit die T-Zellerkennung unterdrücken. Bislang ist von allen EBV-Proteinen das späte lytische Strukturprotein BZLF2 das Einzige für das eine Hemmung der $CD4^+$ T-Zellerkennung beschrieben ist. Sein inhibitorischer Effekt beruht darauf, dass es an MHC-II bindet und sterisch mit der Antigenerkennung durch den

TCR interferiert (Ressing et al., 2003, Ressing et al., 2005). Dass BZLF2 möglicherweise die CD4⁺ T-Zellerkennung lytisch infizierter Zellen negativ beeinflusst, konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung einer BZLF2-defizienten EBV-Mutante ausgeschlossen werden. Nach Induktion der BZLF1-Expression in LCL BZLF2(-)/Tet-BZLF1 konnte der lytische Zyklus von EBV erfolgreich induziert und Virusfreisetzung gemessen werden. Die Strukturantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen erkannten die lytisch infizierten Zellen jedoch nicht direkt, sondern erst nach Virusfreisetzung, so dass BZLF2 nicht den entscheidenden Faktor für die fehlende CD4⁺ T-Zellerkennung lytisch infizierter LCL darstellen konnte (Abbildung 6.20). Möglicherweise interferiert auch das virale lytische Genprodukt BGLF5 mit der CD4⁺ T-Zellerkennung. BGLF5 besitzt eine Exonukleaseaktivität und ist in der Lage, die mRNA von MHC-II abzubauen (Rowe et al., 2007). Inwieweit dies tatsächlich zu einer beeinträchtigten CD4⁺ T-Zellerkennung führt, ist allerdings noch nicht geklärt. Durch Induktion des lytischen Zyklus in einer BGLF5-defizienten LCL könnte zukünftig untersucht werden, ob lytisch infizierte Zellen durch das Fehlen von BGLF5 besser von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden. Möglicherweise sind auch andere, bislang nicht in Betracht gezogene, virale Genprodukte für die Hemmung der CD4⁺ T-Zellerkennung lytisch infizierter Zellen verantwortlich.

Während die Interferenz viraler Genprodukte mit der CD4⁺ T-Zellerkennung demnach noch kaum untersucht ist, wurden bereits mehrere lytische Genprodukte von EBV beschrieben, die effizient mit der CD8⁺ T-Zellerkennung interferieren. Dazu gehören die frühen lytischen Genprodukte BNLF2a, BGLF5 und BILF1 sowie das späte lytische Genprodukt BCRF1, die alle aufgrund unterschiedlicher Mechanismen die Antigenprozessierung und -präsentation auf MHC-I inhibieren (Hislop et al., 2007, Horst et al., 2009, Rowe et al., 2007, Zuo et al., 2008, Zuo et al., 2009, Zeidler et al., 1997). Diese Immunmodulatoren werden dafür verantwortlich gemacht, dass die CD8⁺ T-Zellantwort hauptsächlich gegen sehr frühe und frühe, nicht aber gegen späte lytische EBV-Antigene gerichtet ist (Pudney et al., 2005). Unklar blieb bislang allerdings, wieso EBV auf eine Hemmung der Präsentation sehr früher Antigene verzichtet, und wieso manche Immunmodulatoren wie z.B. BNLF2a nur transient im lytischen Zyklus exprimiert werden (Croft et al., 2009). Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse relativieren zudem die immunregulatorische Bedeutung dieser lytischen Genprodukte. So wurde in dieser Arbeit eine frühe und anhaltende CD8⁺ T-Zellerkennung lytisch infizierter Zellen beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Proteine die Präsentation von viralen Antigenen nicht vollständig hemmen können. Die immunmodulatorische Funktion dieser Proteine wurde meist einzeln und nach Überexpression sowie in heterologen Zellsystemen nachgewiesen. Potentielle Regulatoren der unter-

suchten Immunmodulatoren wie etwa BGLF4 im Falle von BGLF5 blieben somit unberücksichtigt (Feederle et al., 2009b). In welchem Ausmaß lytische Genprodukte mit der T-Zellerkennung im physiologischen Kontext interferieren, ist somit noch unklar.

7.2 Der Einfluss lytischer EBV-Proteine auf die Antigenpräsentation

Mit Fortschreiten des lytischen Zyklus wird eine Abnahme der Expression sowohl von MHC-I als auch MHC-II beobachtet (Guerreiro-Cacais et al., 2007, Keating et al., 2002). Mehrere Studien legen die Vermutung nahe, dass dieser Effekt auf der Expression von viralen Immunmodulatoren beruht (Ressing et al., 2008, Rowe and Zuo, 2010). Die bislang beschriebenen immunmodulatorischen Proteine von EBV sind in der Lage die MHC-I- und MHC-II-assoziierte Antigenpräsentation auf unterschiedliche Art und Weise zu unterdrücken. So können sie die Expression von MHC-I und MHC-II hemmen, den MHC-I-Abbau fördern, die Peptidgenerierung und/oder Peptidbeladung inhibieren oder sterisch mit der CD4⁺ T-Zellerkennung interferieren (Rowe et al., 2007, Zuo et al., 2009, Zeidler et al., 1997, Hislop et al., 2007, Horst et al., 2009, Ressing et al., 2003, Ressing et al., 2005). Da bislang keine synchrone Induktion des lytischen Zyklus von EBV in LCL möglich war, konnte jedoch der Einfluss viraler lytischer Genprodukte auf die Antigenpräsentation nicht im physiologischen Kontext untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten deshalb die experimentellen Grundlagen geschaffen werden, den möglichen Einfluss von viralen Immunmodulatoren auf die Antigenprozessierung und –präsentation im Rahmen des lytischen Zyklus genauer zu analysieren. In zukünftigen Experimenten soll dann zunächst der Einfluss einzelner viraler Genprodukte auf die Präsentation von Modellantigenen untersucht und bei nachgewiesener immunmodulatorischer Funktion anschließend in lytisch infizierten Zellen getestet werden. Von diesen Untersuchungen werden Hinweise darauf erhofft, welche viralen Genprodukte mit der T-Zellerkennung lytisch infizierter Zellen interferieren, und wann sie exprimiert werden. Da eine effiziente Inhibition der Antigenpräsentation eine zeitlich vorgeschaltete Expression des Immunmodulators voraussetzt, sollte im zweiten Teil der Arbeit ein geeignetes Expressionssystem etabliert werden, das eine unabhängige Expression von viralen Kandidatengenen und Modellantigenen erlaubt. Dazu wurden Vektoren verwendet, die eine unabhängige Expression verschiedener Gene durch Zugabe von Doxzyklin bzw. Doxzyklin und Erythromycin gestatteten (Abbildung 6.21).

Für die Etablierung des experimentellen Nachweissystems wurde auf virale Genprodukte mit bereits beschriebenen immunmodulatorischen Funktionen zurückgegriffen. Dazu zählten die EBV-Proteine BGLF5, BILF1 und BZLF2 sowie das HSV-Protein ICP47. Als Modellantigene wurden die EBV-Antigene EBNA3C, LMP2A und BZLF1 ausgewählt, weil ihre Erkennung mit verfügbaren antigenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu testen war.

7.2.1 Kein Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die CD4⁺ T-Zellerkennung von EBNA3C

Die Präsentation eines Epitops des im Kern lokalisierten Proteins EBNA3C auf MHC-II wurde durch keines der hier untersuchten immunmodulatorischen Proteine beeinträchtigt (Abbildung 6.28). Aufgrund der bislang publizierten Daten wäre eine verminderte CD4⁺ T-Zellerkennung von EBNA3C auf MHC-II durch BZLF2 zu erwarten gewesen (Ressing et al., 2003, Ressing et al., 2005).

Der von Ressing et al. (2003 und 2005) publizierte Nachweis der immunmodulatorischen Funktion von BZLF2 basiert allerdings auf Untersuchungen in Melanomzellen. Ob der Zellhintergrund einen Einfluss auf die immunmodulatorische Funktion dieses Proteins hat, oder die beschriebene, sterische Inhibierung der T-Zellerkennung ein durch BZLF2-Überexpression bedingter, unspezifischer Artefakt ist, kann momentan nicht beurteilt werden. Da in der vorliegenden Arbeit darüber hinaus auch keine verbesserte CD4⁺ T-Zellerkennung von lytisch infizierten, BZLF2-defizienten LCL beobachtet wurde, erscheint eine durch BZLF2-vermittelte Inhibition der MHC-II-assoziierten Antigenpräsentation zumindest fraglich.

Auch für BGLF5 konnte keine Beeinträchtigung der CD4⁺ T-Zellerkennung von EBNA3C nachgewiesen werden. Rowe et al. (2007) hatten gezeigt, dass BGLF5 durch seine *shutoff*-Funktion die *de novo* Synthese von zellulären Proteinen einschließlich MHC-I und MHC-II, hemmt. Dennoch wurde bislang nur eine Beeinträchtigung der CD8⁺ T-Zellerkennung beschrieben (Zuo et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde eine niedrigere Grünfluoreszenz in GFP-transfizierten Zellen nach BGLF5-Expression beobachtet. Dies deutete darauf hin, dass BGLF5 zwar funktionell aktiv war und die GFP-mRNA degradierte, jedoch nicht die CD4⁺ T-Zellerkennung beeinträchtigte. Eine immunmodulatorische Funktion von BGLF5 als möglicher Grund für die fehlende CD4⁺ T-Zellerkennung von lytisch infizierten Zellen erscheint daher unwahrscheinlich. Allerdings kann aufgrund der hier erstmals erhaltenen Hinweise auf eine Substratspezifität von BGLF5 (siehe unten), eine Beeinträchtigung der Präsentation einzelner Antigene

auf MHC-II nicht ausgeschlossen werden. Inwieweit die beschriebenen Ergebnisse darüber hinaus auf die Antigenpräsentation während des lytischen Zyklus übertragen werden können, bleibt wegen der Regulation der BGLF5-Funktion durch mindestens ein weiteres, virales Genprodukt ungeklärt (Feederle et al., 2009b). Ob bzw. in welchem Ausmaß BGLF5 zu einer verminderten T-Zellerkennung in lytisch infizierten Zellen führt, soll in zukünftigen Experimenten durch Verwendung von BZLF1-BGLF5-doppelt-defizienten Virusmutanten analysiert werden.

7.2.2 ICP47 und BILF1 interferieren mit der BZLF1-Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen

Für die Untersuchung der MHC-I-restringierten Antigenerkennung wurde das sehr frühe lytische Protein BZLF1 verwendet. Erwartungsgemäß führte die vorgeschaltete Expression des HSV-Proteins ICP47 zu einer fast vollständigen Inhibition der T-Zellerkennung (Abbildung 6.29). Das HSV-Protein ICP47 interferiert erfolgreich mit der Präsentation von Antigenen auf MHC-I, indem es mit Peptiden um die Peptidbindestelle von TAP konkurriert (Fruh et al., 1995, Hill et al., 1995, Ahn et al., 1996, Tomazin et al., 1996).

Auch die Expression des EBV-Proteins BILF1 führte zu einer Abnahme der BZLF1-Präsentation auf MHC-I. Im Gegensatz zu ICP47 hemmte BILF1 die CD8⁺ T-Zellerkennung jedoch nicht komplett. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass BILF1 den lysosomalen Abbau von Peptid-beladenem MHC-I von der Zelloberfläche fördert, was zumindest eine kurzzeitige Antigenerkennung durch T-Zellen gestattet.

Obwohl Zuo et al. (2008) publiziert hatten, dass BGLF5 mit der CD8⁺ T-Zellerkennung von BZLF1 interferierte, konnte in der vorliegenden Arbeit keine Beeinträchtigung bei der BZLF1-Präsentation auf MHC-I beobachtet werden. Die Daten von Zuo et al. (2008) wurden allerdings nach transienter Transfektion von HEK293T-Zellen bzw. einer Melanomzelllinie erhoben. Ob diesen widersprüchlichen Ergebnissen Zelltyp-spezifische Ursachen zu Grunde liegen, ist momentan noch ungeklärt. Für eine eingehendere Bewertung der immunmodulatorischen Funktion von BGLF5 sind deshalb Untersuchungen an lytisch infizierten, BGLF5-BZLF1-doppelt-defizienten LCL geplant.

7.2.3 BGLF5 interferiert mit der LMP2A-Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen

In zwei unabhängigen Studien wurde berichtet, dass das virale Membranprotein LMP2A durch einen TAP-unabhängigen Präsentationsweg auf MHC-I gelangt (Lee et

al., 1996, Khanna et al., 1996). Nachfolgende Untersuchungen ergaben, dass einige, aber nicht alle LMP2A-Epitope TAP-unabhängig präsentiert werden, dass aber die Generierung aller LMP2A-Epitope Proteasom-abhängig ist. Da die hier verwendeten T-Zellen ein als TAP-unabhängig beschriebenes Epitop erkannten, wurde kein Einfluss von ICP47 auf die CD8⁺ T-Zellerkennung von LMP2A erwartet, was in den durchgeführten T-Zellerkennungsversuchen auch bestätigt werden konnte. Wie einige LMP2A-Epitope TAP-unabhängig auf MHC-I gelangen, ist bislang nicht geklärt. Alle TAP-unabhängig präsentierten LMP2A-Epitope weisen allerdings eine hohe Hydrophobizität auf (Lautscham et al., 2003, Lautscham et al., 2001), und möglicherweise erlaubt dieser hydrophobe Charakter der LMP2A-Epitope die Diffusion durch die Membran ins ER-Lumen.

Überraschenderweise zeigte auch die Expression von BILF1 keinen Einfluss auf die LMP2A-Präsentation, obwohl die Internalisierung und Degradation von membranständigen Peptid/MHC-I-Komplexen zu einer verminderten T-Zellerkennung führen sollte. Womöglich bindet BILF1 präferenziell an bestimmte HLA-Allele. Für mehrere virale Immunmodulatoren wurde beschrieben, dass sie die Antigenpräsentation HLA-subklassenspezifisch inhibieren. Beispielsweise hemmt das Nef-Protein des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) die Präsentation von HLA-A und HLA-B, aber nicht HLA-C auf der Zelloberfläche (Cohen et al., 1999). Eine Spezifität für bestimmte HLA-Allele könnte erklären, wieso BILF1 die Präsentation von BZLF1 auf HLA-B15, aber nicht die Präsentation von LMP2A auf HLA-A2 hemmte. Diese Hypothese soll durch die Einbeziehung weiterer HLA-A- und HLA-B-restringierter T-Zellen in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden.

Ebenfalls unerwartet war der inhibitorische Effekt von BGLF5 auf die Präsentation von LMP2A im Kontext von MHC-I. In keinem der vorangegangenen T-Zellerkennungsexperimente hatte BGLF5 die Antigenpräsentation beeinträchtigt. Möglicherweise besitzt auch BGLF5 eine Substratspezifität, die zum Abbau lediglich bestimmter mRNAs führt. Der *shutoff*-Funktion von BGLF5 scheinen nicht nur zelluläre, sondern auch virale mRNAs zu unterliegen (Zuo et al., 2008). Ob bzw. in welchem Ausmaß die beobachtete Inhibition der Genexpression und damit der Antigenpräsentation auch im Rahmen des lytischen Zyklus zum Tragen kommt, müssen zukünftige Experimente in lytisch infizierten B-Zellen zeigen.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die hier untersuchten, viralen Immunmodulatoren weit weniger stark mit der Antigenprozessierung und -präsentation auf MHC-I interferieren, als bislang angenommen. Diese Einschätzung

wird auch durch die frühzeitige und anhaltende Erkennung lytisch infizierter B-Zellen durch EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen unterstützt. Dagegen spricht die fehlende, direkte Erkennung lytisch infizierter Zellen durch Strukturantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen für eine effiziente Hemmung der MHC-II-assoziierten Antigenpräsentation. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass dafür weder BZLF2 noch BGLF5 verantwortlich sind. Ob bzw. in welchem Ausmaß weitere, bislang nicht in Betracht gezogene, virale Proteine die Präsentation von Antigenen auf MHC-II hemmen, ist noch ungeklärt. Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten, konditionalen Testsystems kann der Einfluss viraler Kandidatenproteine auf die Präsentation von Modellantigenen schnell und einfach analysiert werden. Diese Untersuchungen mit Hilfe des neu etablierten Testsystems sollten weitere Erkenntnisse darüber liefern, welche viralen Immunevasionsstrategien zur lebenslangen Persistenz von EBV im menschlichen Wirt beitragen.

7.3 Ausblick

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte, konditional lytische Zellsystem erlaubt neben einer eingehenden Charakterisierung der lytischen Phase von EBV auch neue Einblicke in die Virus-Wirt-Interaktion. Der Fokus nachfolgender Untersuchungen wird auf zwei Fragen liegen, die sich aus dieser Arbeit ergeben haben und die sich mit Hilfe des beschriebenen Zellsystems beantworten lassen sollten: Welche Mechanismen verhindern die CD4⁺ T-Zellerkennung lytisch infizierter Zellen und welche Prozesse sind für den Abbruch des lytischen Zyklus in manchen Zelllinien verantwortlich?

Für die Beantwortung der ersten Frage soll zunächst der Beginn der Inhibition der CD4⁺ T-Zellerkennung näher bestimmt werden. Dies kann mit Hilfe der konditionalen Expression eines Modellantigens zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des lytischen Zyklus gelingen. Über die Analyse einzelner, zu diesem Zeitpunkt exprimierter lytischer Gene sollen potentielle virale Immunmodulatoren identifiziert und ihre Funktion im lytischen Zyklus durch die Verwendung von EBV-Mutanten, denen das entsprechende Gen fehlt, verifiziert werden.

Um die Ursache für den Abbruch des lytischen Zyklus aufzuklären, sollen Transkriptomanalysen von produktiv und nicht-produktiv lytisch infizierten Zellen durchgeführt werden. Anschließend sollen unterschiedlich exprimierte Kandidatengene während des lytischen Zyklus exprimiert und so ihre Funktion im physiologischen Kontext überprüft werden. Da die lytische Replikation eine essentielle Phase im Lebenszyklus von EBV darstellt, könnte die gezielte Modulation dieses Kontrollpunkts einen neuen Ansatz zur Bekämpfung der Infektionsausbreitung sowie der Viruspersistenz darstellen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des linearen EBV-Genoms.....	8
Abbildung 3.2: Klassischer MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg.....	17
Abbildung 3.3: Modulation der MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Antigenpräsentations- wege durch lytische EBV-Proteine.....	23
Abbildung 6.1: Induktion des lytischen Zyklus von EBV in LCL und EBV-positiven Burkitt-Lymphomzelllinien.	55
Abbildung 6.2: Kinetik der EBV-spezifischen T-Zellerkennung von LCL JM und LCL GB nach Induktion des lytischen Zyklus durch TPA.....	57
Abbildung 6.3: Schematische Darstellung der verwendeten BZLF1-Expressionsplasmide	59
Abbildung 6.4: Induktion des lytischen Zyklus in LCL GB/Tet-BZLF1 in Abhängigkeit von Doxozyklin	61
Abbildung 6.5: Induktion des lytischen Zyklus in LCL GB/Tet-BZLF1-TxER in Abhängigkeit von Doxozyklin und Tamoxifen.	62
Abbildung 6.6: Induktion des lytischen Zyklus in LCL GB/Ery-BZLF1 in Abhängigkeit von Doxozyklin und Erythromycin.	63
Abbildung 6.7: Expression sehr früher und früher Antigene nach Induktion des lytischen Zyklus von EBV in LCL GB/Tet-BZLF1..	64
Abbildung 6.8: Bestimmung des Zeitpunktes der Virusfreisetzung aus LCL GB/Tet-BZLF1.	66
Abbildung 6.9: EBV-spezifische T-Zellerkennung von LCL GB/Tet-BZLF1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der BZLF1-Expression.	67
Abbildung 6.10: EBV-spezifische T-Zellerkennung von LCL GB/Tet-BZLF1 im Zeitraum von 12-30 h nach Induktion des lytischen Zyklus.	69
Abbildung 6.11: Untersuchung der Induzierbarkeit des lytischen Zyklus von EBV in LCL Z(-) verschiedener Spender.	70
Abbildung 6.12: Expression sehr früher und früher Antigene in LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1 nach Doxozyklin-Behandlung.....	71
Abbildung 6.13: Untersuchung der Expression lytischer Proteine nach Induktion von BZLF1 in den LCL Z(-) TG/Tet-BZLF1 und LCL Z(-) JM/Tet-BZLF1 „alt“ und deren Erkennung durch den Strukturprotein-spezifischen T-Zellklon BLLF1-1D6.	72
Abbildung 6.14: Induktion des lytischen Zyklus von EBV in drei stabil transfizierten LCL Z(-)- Linien des Spenders JM.	74
Abbildung 6.15: Kinetik der T-Zellerkennung von frühen und späten lytischen Antigenen nach Induktion des lytischen Zyklus von EBV in zwei stabil transfizierten LCL Z(-) Linien des Spenders JM.	75
Abbildung 6.16: Vergleich der Kinetik der direkten Erkennung von lytisch infizierten Zellen durch BLLF1-spezifische T-Zellen mit dem Zeitpunkt der Virusfreisetzung.....	76

Abbildung 6.17: Bestimmung des Zeitpunktes der Zytokinfreisetzung durch T-Zellen nach Stimulation mit lytisch infizierten Zellen und nach Induktion des lytischen Zyklus in LCL Z(-) JM-I/Tet-BZLF1.....	78
Abbildung 6.18: Lytisch infizierte Zelllinien werden nicht direkt von CD4 ⁺ T-Zellen erkannt.....	79
Abbildung 6.19: BLLF1-Antigene können über einen endogenen Präsentationsweg auf MHC-Klasse-II präsentiert werden.	80
Abbildung 6.20: Das späte lytische Genprodukt BZLF2 interferiert nicht mit der CD4 ⁺ T-Zellerkennung von lytisch infizierten Zelllinien.....	82
Abbildung 6.21: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionsplasmide.	85
Abbildung 6.22: Nachweis der induzierbaren EBNA3C-Expression in den stabil transfizierten Zelllinien.	87
Abbildung 6.23: Nachweis der induzierbaren BZLF1-Expression in den stabil transfizierten LCL GB W3.....	89
Abbildung 6.24: Bestimmung des Anteils an transfizierten Zellen in den generierten LCL 1.11-Transfektanten.	91
Abbildung 6.25: Doxyzyklin- und Erythromycin-abhängige Expression von LMP2A in HEK293T-Zellen.	92
Abbildung 6.26: Doxyzyklinabhängige Expression von BNLF2a und BGLF5 in HEK293T-Zellen.....	92
Abbildung 6.27: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung.....	93
Abbildung 6.28: Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die CD4 ⁺ T-Zellerkennung von EBNA3C..	95
Abbildung 6.29: Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die CD8 ⁺ T-Zellerkennung von BZLF1.....	97
Abbildung 6.30: Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die CD8 ⁺ T-Zellerkennung von LMP2A.....	98
Abbildung 6.31: Einfluss der immunmodulatorischen Proteine auf die CD8 ⁺ T-Zellerkennung von LMP2A.....	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Expressionsmuster viraler Gene in latent infizierten B-Zellen.	11
Tabelle 4.1: HLA-Genotyp der Zelllinien	26
Tabelle 4.2: Spezifität und Restriktion der verwendeten T-Zellen.	27
Tabelle 4.3: Verwendete Plasmide.....	28
Tabelle 4.4: Antikörper	30
Tabelle 4.5: Zytokine	30
Tabelle 4.6: Chemikalien	31
Tabelle 4.7: Verbrauchsmaterial/-flüssigkeiten	32
Tabelle 4.8: Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen	33
Tabelle 4.9: Zellkulturmedien	34
Tabelle 4.10: Geräte.....	35
Tabelle 5.1: Ansatz des Restriktionsverdau	38
Tabelle 5.2: Ansatz für den Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	39
Tabelle 5.3: Ansatz für die Synthese von glatten Enden mit T4-DNA-Polymerase	40
Tabelle 5.4: Ansatz der Ligation	40
Tabelle 5.5: Verdünnung der verwendeten Primärantikörper	45
Tabelle 5.6: Transfektions-Mix	49
Tabelle 6.1: Beschreibung der stabil transfizierte Zelllinien.....	60
Tabelle 6.2: EBNA3C-Expressionsplasmide und die generierten LCL GB-Ag-Zelllinien.....	86
Tabelle 6.3: BZLF1-Expressionsplasmide und die generierten LCL GB-W3-Zelllinien	88
Tabelle 6.4: LMP2A-Expressionsplasmide und die damit generierten LCL 1.11- bzw. JM AgIII-Transfektanten	90

Literaturverzeichnis

- ADHIKARY, D., BEHREND, U., BOERSCHMANN, H., PFUNDER, A., BURDACH, S., MOOSMANN, A., WITTER, K., BORNKAMM, G. W. & MAUTNER, J. 2007. Immunodominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cell preparations for therapy. *PLoS One*, 2, e583.
- ADHIKARY, D., BEHREND, U., FEEDERLE, R., DELECLUSE, H. J. & MAUTNER, J. 2008. Standardized and highly efficient expansion of Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cells by using virus-like particles. *J Virol*, 82, 3903-11.
- ADHIKARY, D., BEHREND, U., MOOSMANN, A., WITTER, K., BORNKAMM, G. W. & MAUTNER, J. 2006. Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med*, 203, 995-1006.
- AHN, K., MEYER, T. H., UEBEL, S., SEMPE, P., DJABALLAH, H., YANG, Y., PETERSON, P. A., FRUH, K. & TAMPE, R. 1996. Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *EMBO J*, 15, 3247-55.
- BAER, R., BANKIER, A. T., BIGGIN, M. D., DEININGER, P. L., FARRELL, P. J., GIBSON, T. J., HATFULL, G., HUDSON, G. S., SATCHWELL, S. C., SEGUIN, C. & ET AL. 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310, 207-11.
- BAUM, C., FORSTER, P., HEGEWISCH-BECKER, S. & HARBERS, K. 1994. An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques*, 17, 1058-62.
- BAYLIS, S. A., PURIFOY, D. J. & LITTLER, E. 1989. The characterization of the EBV alkaline deoxyribonuclease cloned and expressed in E. coli. *Nucleic Acids Res*, 17, 7609-22.
- BEISSER, P. S., VERZIJL, D., GRUIJTHUIJSEN, Y. K., BEUKEN, E., SMIT, M. J., LEURS, R., BRUGGEMAN, C. A. & VINK, C. 2005. The Epstein-Barr virus BILF1 gene encodes a G protein-coupled receptor that inhibits phosphorylation of RNA-dependent protein kinase. *J Virol*, 79, 441-9.
- BEN-SASSON, S. A. & KLEIN, G. 1981. Activation of the Epstein-Barr virus genome by 5-aza-cytidine in latently infected human lymphoid lines. *Int J Cancer*, 28, 131-5.
- BHENDE, P. M., SEAMAN, W. T., DELECLUSE, H. J. & KENNEY, S. C. 2004. The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat Genet*, 36, 1099-104.
- BHENDE, P. M., SEAMAN, W. T., DELECLUSE, H. J. & KENNEY, S. C. 2005. BZLF1 activation of the methylated form of the BRLF1 immediate-early promoter is regulated by BZLF1 residue 186. *J Virol*, 79, 7338-48.
- BORNKAMM, G. W., BERENS, C., KUKLIK-ROOS, C., BECHET, J. M., LAUX, G., BACHL, J., KORNDORFER, M., SCHLEE, M., HOLZEL, M., MALAMOSSI, A., CHAPMAN, R. D., NIMMERJAHN, F., MAUTNER, J., HILLEN, W., BUJARD, H. & FEUILLARD, J. 2005. Stringent doxycycline-dependent control

- of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res*, 33, e137.
- BORNKAMM, G. W. & HAMMERSCHMIDT, W. 2001. Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356, 437-59.
- BURKITT, D. 1958. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*, 46, 218-23.
- BURKITT, D., HUTT, M. S. & WRIGHT, D. H. 1965. The African Lymphoma: Preliminary Observations on Response to Therapy. *Cancer*, 18, 399-410.
- CALLAN, M. F., TAN, L., ANNELS, N., OGG, G. S., WILSON, J. D., O'CALLAGHAN, C. A., STEVEN, N., MCMICHAEL, A. J. & RICKINSON, A. B. 1998. Direct visualization of antigen-specific CD8⁺ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med*, 187, 1395-402.
- CALLAN, M. F. 2004. The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes Infect*, 6, 937-45.
- CARBONE, A. 2003. Emerging pathways in the development of AIDS-related lymphomas. *Lancet Oncol*, 4, 22-9.
- CHANG, Y. N., DONG, D. L., HAYWARD, G. S. & HAYWARD, S. D. 1990. The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J Virol*, 64, 3358-69.
- CHEUNG, A. & KIEFF, E. 1982. Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA. *J Virol*, 44, 286-94.
- CHUNG, C. T., NIEMELA, S. L. & MILLER, R. H. 1989. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2172-5.
- COHEN, G. B., GANDHI, R. T., DAVIS, D. M., MANDELBOIM, O., CHEN, B. K., STROMINGER, J. L. & BALTIMORE, D. 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity*, 10, 661-71.
- COHEN, J. I. 2000. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med*, 343, 481-92.
- COMOLI, P., LABIRIO, M., BASSO, S., BALDANTI, F., GROSSI, P., FURIONE, M., VIGANO, M., FIOCCHI, R., ROSSI, G., GINEVRI, F., GRIDELLI, B., MORETTA, A., MONTAGNA, D., LOCATELLI, F., GERNA, G. & MACCARIO, R. 2002. Infusion of autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for prevention of EBV-related lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients with evidence of active virus replication. *Blood*, 99, 2592-8.
- CORDIER, M., CALENDER, A., BILLAUD, M., ZIMBER, U., ROUSSELET, G., PAVLISH, O., BANCHEREAU, J., TURSZ, T., BORNKAMM, G. & LENOIR, G. M. 1990. Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol*, 64, 1002-13.
- CROCE, C. M., THIERFELDER, W., ERIKSON, J., NISHIKURA, K., FINAN, J., LENOIR, G. M. & NOWELL, P. C. 1983. Transcriptional activation of an

- unrearranged and untranslocated c-myc oncogene by translocation of a C lambda locus in Burkitt. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 6922-6.
- CROFT, N. P., SHANNON-LOWE, C., BELL, A. I., HORST, D., KREMMER, E., RESSING, M. E., WIERTZ, E. J., MIDDELDORP, J. M., ROWE, M., RICKINSON, A. B. & HISLOP, A. D. 2009. Stage-specific inhibition of MHC class I presentation by the Epstein-Barr virus BNLF2a protein during virus lytic cycle. *PLoS Pathog*, 5, e1000490.
- DAMBAUGH, T. R. & KIEFF, E. 1982. Identification and nucleotide sequences of two similar tandem direct repeats in Epstein-Barr virus DNA. *J Virol*, 44, 823-33.
- DI RENZO, L., ALTIOK, A., KLEIN, G. & KLEIN, E. 1994. Endogenous TGF-beta contributes to the induction of the EBV lytic cycle in two Burkitt lymphoma cell lines. *Int J Cancer*, 57, 914-9.
- DOERR, H. W., GERLICH, W. H. 2009. Medizinische Virologie; Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder; *Thieme-Verlag*
- DUKERS, D. F., MEIJ, P., VERVOORT, M. B., VOS, W., SCHEPER, R. J., MEIJER, C. J., BLOEMENA, E. & MIDDELDORP, J. M. 2000. Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *J Immunol*, 165, 663-70.
- ELLIS, A. L., WANG, Z., YU, X. & MERTZ, J. E. 2010. Either ZEB1 or ZEB2/SIP1 can play a central role in regulating the Epstein-Barr virus latent-lytic switch in a cell-type-specific manner. *J Virol*, 84, 6139-52.
- EPSTEIN, M. A., ACHONG, B. G. & BARR, Y. M. 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, 1, 702-3.
- EVANS, A. S. 1972. Clinical syndromes associated with EB virus infection. *Adv Intern Med*, 18, 77-93.
- FAGGIONI, A., ZOMPETTA, C., GRIMALDI, S., BARILE, G., FRATI, L. & LAZDINS, J. 1986. Calcium modulation activates Epstein-Barr virus genome in latently infected cells. *Science*, 232, 1554-6.
- FARRELL, P. J., ROWE, D. T., ROONEY, C. M. & KOUZARIDES, T. 1989. Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *EMBO J*, 8, 127-32.
- FAULKNER, G. C., KRAJEWSKI, A. S. & CRAWFORD, D. H. 2000. The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol*, 8, 185-9.
- FEEDERLE, R., BANNERT, H., LIPS, H., MULLER-LANTZSCH, N. & DELECLUSE, H. J. 2009a. The Epstein-Barr virus alkaline exonuclease BGLF5 serves pleiotropic functions in virus replication. *J Virol*, 83, 4952-62.
- FEEDERLE, R., MEHL-LAUTSCHAM, A. M., BANNERT, H. & DELECLUSE, H. J. 2009b. The Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 and the exonuclease BGLF5 have opposite effects on the regulation of viral protein production. *J Virol*, 83, 10877-91.
- FINGEROTH, J. D., WEIS, J. J., TEDDER, T. F., STROMINGER, J. L., BIRO, P. A. & FEARON, D. T. 1984. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 4510-4.

- FIXMAN, E. D., HAYWARD, G. S. & HAYWARD, S. D. 1995. Replication of Epstein-Barr virus oriLyf: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays. *J Virol*, 69, 2998-3006.
- FLEMINGTON, E. & SPECK, S. H. 1990. Evidence for coiled-coil dimer formation by an Epstein-Barr virus transactivator that lacks a heptad repeat of leucine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9459-63.
- FLEMINGTON, E. K., BORRAS, A. M., LYTLE, J. P. & SPECK, S. H. 1992. Characterization of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein transactivation domain. *J Virol*, 66, 922-9.
- FRUH, K., AHN, K., DJABALLAH, H., SEMPE, P., VAN ENDERT, P. M., TAMPE, R., PETERSON, P. A. & YANG, Y. 1995. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature*, 375, 415-8.
- FUJII, K., YOKOYAMA, N., KIYONO, T., KUZUSHIMA, K., HOMMA, M., NISHIYAMA, Y., FUJITA, M. & TSURUMI, T. 2000. The Epstein-Barr virus pol catalytic subunit physically interacts with the BBLF4-BSLF1-BBLF2/3 complex. *J Virol*, 74, 2550-7.
- GARDELLA, T., MEDVECZKY, P., SAIRENJI, T. & MULDER, C. 1984. Detection of circular and linear herpesvirus DNA molecules in mammalian cells by gel electrophoresis. *J Virol*, 50, 248-54.
- GERBER, P., LUCAS, S., NONOYAMA, M., PERLIN, E. & GOLDSTEIN, L. I. 1972. Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet*, 2, 988-9.
- GIVEN, D., YEE, D., GRIEM, K. & KIEFF, E. 1979. DNA of Epstein-Barr virus. V. Direct repeats of the ends of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol*, 30, 852-62.
- GLASER, S. L., LIN, R. J., STEWART, S. L., AMBINDER, R. F., JARRETT, R. F., BROUSSET, P., PALLESEN, G., GULLEY, M. L., KHAN, G., O'GRADY, J., HUMMEL, M., PRECIADO, M. V., KNECHT, H., CHAN, J. K. & CLAVIEZ, A. 1997. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer*, 70, 375-82.
- GOSSEN, M., FREUNDLIEB, S., BENDER, G., MULLER, G., HILLEN, W. & BUJARD, H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268, 1766-9.
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. & NAIRN, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- GUERREIRO-CACAIS, A. O., UZUNEL, M., LEVITSKAYA, J. & LEVITSKY, V. 2007. Inhibition of heavy chain and beta2-microglobulin synthesis as a mechanism of major histocompatibility complex class I downregulation during Epstein-Barr virus replication. *J Virol*, 81, 1390-400.
- HALPRIN, J., SCOTT, A. L., JACOBSON, L., LEVINE, P. H., HO, J. H., NIEDERMAN, J. C., HAYWARD, S. D. & MILMAN, G. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to Epstein-Barr virus nuclear and early antigens in patients with infectious mononucleosis and nasopharyngeal carcinoma. *Ann Intern Med*, 104, 331-7.

- HAMMERSCHMIDT, W. & SUGDEN, B. 1988. Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell*, 55, 427-33.
- HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80.
- HAQUE, T., WILKIE, G. M., JONES, M. M., HIGGINS, C. D., URQUHART, G., WINGATE, P., BURNS, D., MCAULAY, K., TURNER, M., BELLAMY, C., AMLLOT, P. L., KELLY, D., MACGILCHRIST, A., GANDHI, M. K., SWERDLOW, A. J. & CRAWFORD, D. H. 2007. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood*, 110, 1123-31.
- HAQUE, T., WILKIE, G. M., TAYLOR, C., AMLLOT, P. L., MURAD, P., ILEY, A., DOMBAGODA, D., BRITTON, K. M., SWERDLOW, A. J. & CRAWFORD, D. H. 2002. Treatment of Epstein-Barr-virus-positive post-transplantation lymphoproliferative disease with partly HLA-matched allogeneic cytotoxic T cells. *Lancet*, 360, 436-42.
- HARRIS, N. L., JAFFE, E. S., STEIN, H., BANKS, P. M., CHAN, J. K., CLEARY, M. L., DELSOL, G., DE WOLF-PEETERS, C., FALINI, B., GATTER, K. C. & ET AL. 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84, 1361-92.
- HEATH, W. R. & CARBONE, F. R. 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol*, 1, 126-34.
- HENLE, G., HENLE, W. & DIEHL, V. 1968. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-ypse virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 59, 94-101.
- HILL, A., JUGOVIC, P., YORK, I., RUSS, G., BENNINK, J., YEWDELL, J., PLOEGH, H. & JOHNSON, D. 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature*, 375, 411-5.
- HISLOP, A. D., RESSING, M. E., VAN LEEUWEN, D., PUDNEY, V. A., HORST, D., KOPPERS-LALIC, D., CROFT, N. P., NEEFJES, J. J., RICKINSON, A. B. & WIERTZ, E. J. 2007. A CD8+ T cell immune evasion protein specific to Epstein-Barr virus and its close relatives in Old World primates. *J Exp Med*, 204, 1863-73.
- HOCHBERG, D., MIDDELDORP, J. M., CATALINA, M., SULLIVAN, J. L., LUZURIAGA, K. & THORLEY-LAWSON, D. A. 2004. Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 239-44.
- HORST, D., VAN LEEUWEN, D., CROFT, N. P., GARSTKA, M. A., HISLOP, A. D., KREMMER, E., RICKINSON, A. B., WIERTZ, E. J. & RESSING, M. E. 2009. Specific targeting of the EBV lytic phase protein BNLF2a to the transporter associated with antigen processing results in impairment of HLA class I-restricted antigen presentation. *J Immunol*, 182, 2313-24.
- HUMMEL, M., ANAGNOSTOPOULOS, I., KORBHUHN, P. & STEIN, H. 1995. Epstein-Barr virus in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: unexpected infection patterns

- and different infection incidence in low- and high-grade types. *J Pathol*, 175, 263-71.
- IARC 1997. Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. Lyon, France, 17-24 June 1997. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 70, 1-492.
- JANZ, A., OEZEL, M., KURZEDER, C., MAUTNER, J., PICH, D., KOST, M., HAMMERSCHMIDT, W. & DELECLUSE, H. J. 2000. Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol*, 74, 10142-52.
- JENKINS, P. J., BINNE, U. K. & FARRELL, P. J. 2000. Histone acetylation and reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *J Virol*, 74, 710-20.
- JOHANNSEN, E., LUFTIG, M., CHASE, M. R., WEICKSEL, S., CAHIR-MCFARLAND, E., ILLANES, D., SARRACINO, D. & KIEFF, E. 2004. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 16286-91.
- JONES, J. F., SHURIN, S., ABRAMOWSKY, C., TUBBS, R. R., SCIOTTO, C. G., WAHL, R., SANDS, J., GOTTMAN, D., KATZ, B. Z. & SKLAR, J. 1988. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med*, 318, 733-41.
- JONES, K., NOURSE, J., CORBETT, G. & GANDHI, M. K. 2010. Sodium valproate in combination with ganciclovir induces lysis of EBV-infected lymphoma cells without impairing EBV-specific T-cell immunity. *Int J Lab Hematol*, 32, e169-74.
- KALLA, M., SCHMEINCK, A., BERGBAUER, M., PICH, D. & HAMMERSCHMIDT, W. 2010. AP-1 homolog BZLF1 of Epstein-Barr virus has two essential functions dependent on the epigenetic state of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 850-5.
- KANEGANE, H., WANG, F. & TOSATO, G. 1996. Virus-cell interactions in a natural killer-like cell line from a patient with lymphoblastic lymphoma. *Blood*, 88, 4667-75.
- KAYE, K. M., IZUMI, K. M. & KIEFF, E. 1993. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 9150-4.
- KEATING, S., PRINCE, S., JONES, M. & ROWE, M. 2002. The lytic cycle of Epstein-Barr virus is associated with decreased expression of cell surface major histocompatibility complex class I and class II molecules. *J Virol*, 76, 8179-88.
- KENNEY, S. C. 2007. Reactivation and lytic replication of EBV.
- KHANNA, R., BURROWS, S. R., MOSS, D. J. & SILINS, S. L. 1996. Peptide transporter (TAP-1 and TAP-2)-independent endogenous processing of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A: implications for cytotoxic T-lymphocyte control of EBV-associated malignancies. *J Virol*, 70, 5357-62.
- KHANNA, R., BURROWS, S. R., THOMSON, S. A., MOSS, D. J., CRESSWELL, P., POULSEN, L. M. & COOPER, L. 1997. Class I processing-defective Burkitt's lymphoma cells are recognized efficiently by CD4+ EBV-specific CTLs. *J Immunol*, 158, 3619-25.

- KIEFF, E. & RICKINSON, A. 2006. Epstein-Barr Virus and its replication. In: KNIPE, D. M. H., PETER M. UND GRIFFIN, DIANE E. (ed.) *Fields Virology*. 5th ed.: Lippincott Williams & Wilkins
- KILGER, E., KIESER, A., BAUMANN, M. & HAMMERSCHMIDT, W. 1998. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J*, 17, 1700-9.
- KLEIN, G., GIOVANELLA, B. C., LINDAHL, T., FIALKOW, P. J., SINGH, S. & STEHLIN, J. S. 1974. Direct evidence for the presence of Epstein-Barr virus DNA and nuclear antigen in malignant epithelial cells from patients with poorly differentiated carcinoma of the nasopharynx. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 4737-41.
- KNOPF, C. W. & WEISSHART, K. 1990. Comparison of exonucleolytic activities of herpes simplex virus type-1 DNA polymerase and DNase. *Eur J Biochem*, 191, 263-73.
- KOUZARIDES, T., PACKHAM, G., COOK, A. & FARRELL, P. J. 1991. The BZLF1 protein of EBV has a coiled coil dimerisation domain without a heptad leucine repeat but with homology to the C/EBP leucine zipper. *Oncogene*, 6, 195-204.
- KRAUS, R. J., MIROCHA, S. J., STEPHANY, H. M., PUCHALSKI, J. R. & MERTZ, J. E. 2001. Identification of a novel element involved in regulation of the lytic switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol*, 75, 867-77.
- KRAUS, R. J., PERRIGOUE, J. G. & MERTZ, J. E. 2003. ZEB negatively regulates the lytic-switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol*, 77, 199-207.
- KULWICHIT, W., EDWARDS, R. H., DAVENPORT, E. M., BASKAR, J. F., GODFREY, V. & RAAB-TRAUB, N. 1998. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11963-8.
- KUPPERS, R. 2003. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol*, 3, 801-12.
- KUTOK, J. L. & WANG, F. 2006. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol*, 1, 375-404.
- LAICHALK, L. L. & THORLEY-LAWSON, D. A. 2005. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol*, 79, 1296-307.
- LAUTSCHAM, G., HAIGH, T., MAYRHOFER, S., TAYLOR, G., CROOM-CARTER, D., LEESE, A., GADOLA, S., CERUNDOLO, V., RICKINSON, A. & BLAKE, N. 2003. Identification of a TAP-independent, immunoproteasome-dependent CD8+ T-cell epitope in Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. *J Virol*, 77, 2757-61.
- LAUTSCHAM, G., MAYRHOFER, S., TAYLOR, G., HAIGH, T., LEESE, A., RICKINSON, A. & BLAKE, N. 2001. Processing of a multiple membrane spanning Epstein-Barr virus protein for CD8(+) T cell recognition reveals a proteasome-dependent, transporter associated with antigen processing-independent pathway. *J Exp Med*, 194, 1053-68.

- LEE, M. A., DIAMOND, M. E. & YATES, J. L. 1999. Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J Virol*, 73, 2974-82.
- LEE, S. P., THOMAS, W. A., BLAKE, N. W. & RICKINSON, A. B. 1996. Transporter (TAP)-independent processing of a multiple membrane-spanning protein, the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. *Eur J Immunol*, 26, 1875-83.
- LEE, S. P., WALLACE, L. E., MACKETT, M., ARRAND, J. R., SEARLE, P. F., ROWE, M. & RICKINSON, A. B. 1993. MHC class II-restricted presentation of endogenously synthesized antigen: Epstein-Barr virus transformed B cell lines can present the viral glycoprotein gp340 by two distinct pathways. *Int Immunol*, 5, 451-60.
- LEVITSKAYA, J., SHARIPO, A., LEONCHIKS, A., CIECHANOVER, A. & MASUCCI, M. G. 1997. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12616-21.
- LI, D., QIAN, L., CHEN, C., SHI, M., YU, M., HU, M., SONG, L., SHEN, B. & GUO, N. 2009. Down-regulation of MHC class II expression through inhibition of CIITA transcription by lytic transactivator Zta during Epstein-Barr virus reactivation. *J Immunol*, 182, 1799-809.
- LIEBERMAN, P. M., HARDWICK, J. M., SAMPLE, J., HAYWARD, G. S. & HAYWARD, S. D. 1990. The zta transactivator involved in induction of lytic cycle gene expression in Epstein-Barr virus-infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions. *J Virol*, 64, 1143-55.
- LINDAHL, T., ADAMS, A., BJURSELL, G., BORNKAMM, G. W., KASCHKA-DIERICH, C. & JEHN, U. 1976. Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J Mol Biol*, 102, 511-30.
- LONG, H. M., HAIGH, T. A., GUDGEON, N. H., LEEN, A. M., TSANG, C. W., BROOKS, J., LANDAIS, E., HOUSSAINT, E., LEE, S. P., RICKINSON, A. B. & TAYLOR, G. S. 2005. CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *J Virol*, 79, 4896-907.
- LONGNECKER, R. 2000. Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res*, 79, 175-200.
- LONGNECKER, R. & MILLER, C. L. 1996. Regulation of Epstein-Barr virus latency by latent membrane protein 2. *Trends Microbiol*, 4, 38-42.
- LUKA, J., KALLIN, B. & KLEIN, G. 1979. Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology*, 94, 228-31.
- MAINI, M. K., GUDGEON, N., WEDDERBURN, L. R., RICKINSON, A. B. & BEVERLEY, P. C. 2000. Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype. *J Immunol*, 165, 5729-37.
- MANNICK, J. B., COHEN, J. I., BIRKENBACH, M., MARCHINI, A. & KIEFF, E. 1991. The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol*, 65, 6826-37.

- MASUCCI, M. G. & ERNBERG, I. 1994. Epstein-Barr virus: adaptation to a life within the immune system. *Trends Microbiol*, 2, 125-30.
- MILLER, C. L., LEE, J. H., KIEFF, E. & LONGNECKER, R. 1994. An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 772-6.
- MILLER, G. & LIPMAN, M. 1973. Comparison of the yield of infectious virus from clones of human and simian lymphoblastoid lines transformed by Epstein-Barr virus. *J Exp Med*, 138, 1398-412.
- MILLER, G., SHOPE, T., LISCO, H., STITT, D. & LIPMAN, M. 1972. Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69, 383-7.
- MIYASHITA, E. M., YANG, B., BABCOCK, G. J. & THORLEY-LAWSON, D. A. 1997. Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol*, 71, 4882-91.
- MODROW, S., FALKE, D. 2002. Molekulare Virologie. Heidelberg: *Spektrum Akademischer Verlag*
- MOORE, K. W., VIEIRA, P., FIORENTINO, D. F., TROUNSTINE, M. L., KHAN, T. A. & MOSMANN, T. R. 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science*, 248, 1230-4.
- MORRISON, T. E., MAUSER, A., WONG, A., TING, J. P. & KENNEY, S. C. 2001. Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein. *Immunity*, 15, 787-99.
- MURPHY, K., TRAVERS, P., WALPORT, M. 2008. Janeway's immunobiology. Seventh edition. *Garland Science*.
- NIEDOBITEK, G., HANSMANN, M. L., HERBST, H., YOUNG, L. S., DIENEMANN, D., HARTMANN, C. A., FINN, T., PITTEROFF, S., WELT, A., ANAGNOSTOPOULOS, I. & ET AL. 1991. Epstein-Barr virus and carcinomas: undifferentiated carcinomas but not squamous cell carcinomas of the nasopharynx are regularly associated with the virus. *J Pathol*, 165, 17-24.
- NISHIKURA, K., AR-RUSHDI, A., ERIKSON, J., WATT, R., ROVERA, G. & CROCE, C. M. 1983. Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogenes in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 4822-6.
- PACKHAM, G., ECONOMOU, A., ROONEY, C. M., ROWE, D. T. & FARRELL, P. J. 1990. Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *J Virol*, 64, 2110-6.
- PALUDAN, C., BICKHAM, K., NIKIFOROW, S., TSANG, M. L., GOODMAN, K., HANEKOM, W. A., FONTENEAU, J. F., STEVANOVIC, S. & MUNZ, C. 2002. Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol*, 169, 1593-603.
- PAYA, C. V., FUNG, J. J., NALESNIK, M. A., KIEFF, E., GREEN, M., GORES, G., HABERMANN, T. M., WIESNER, P. H., SWINNEN, J. L., WOODLE, E. S. & BROMBERG, J. S. 1999. Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The

- Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. *Transplantation*, 68, 1517-25.
- PEAR, W. S., NOLAN, G. P., SCOTT, M. L. & BALTIMORE, D. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 8392-6.
- PUDNEY, V. A., LEESE, A. M., RICKINSON, A. B. & HISLOP, A. D. 2005. CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J Exp Med*, 201, 349-60.
- QU, L. & ROWE, D. T. 1992. Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes. *J Virol*, 66, 3715-24.
- RAWLINS, D. R., MILMAN, G., HAYWARD, S. D. & HAYWARD, G. S. 1985. Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell*, 42, 859-68.
- RESSING, M. E., HORST, D., GRIFFIN, B. D., TELLAM, J., ZUO, J., KHANNA, R., ROWE, M. & WIERTZ, E. J. 2008. Epstein-Barr virus evasion of CD8(+) and CD4(+) T cell immunity via concerted actions of multiple gene products. *Semin Cancer Biol*, 18, 397-408.
- RESSING, M. E., VAN LEEUWEN, D., VERRECK, F. A., GOMEZ, R., HEEMSKERK, B., TOEBES, M., MULLEN, M. M., JARDETZKY, T. S., LONGNECKER, R., SCHILHAM, M. W., OTTENHOFF, T. H., NEEFJES, J., SCHUMACHER, T. N., HUTT-FLETCHER, L. M. & WIERTZ, E. J. 2003. Interference with T cell receptor-HLA-DR interactions by Epstein-Barr virus gp42 results in reduced T helper cell recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 11583-8.
- RESSING, M. E., VAN LEEUWEN, D., VERRECK, F. A., KEATING, S., GOMEZ, R., FRANKEN, K. L., OTTENHOFF, T. H., SPRIGGS, M., SCHUMACHER, T. N., HUTT-FLETCHER, L. M., ROWE, M. & WIERTZ, E. J. 2005. Epstein-Barr virus gp42 is posttranslationally modified to produce soluble gp42 that mediates HLA class II immune evasion. *J Virol*, 79, 841-52.
- RICKINSON, A. B., YOUNG, L. S. & ROWE, M. 1987. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol*, 61, 1310-7.
- RICKINSON, A. & KIEFF, E. 2006. Epstein-Barr Virus. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. & GRIFFIN, D. E. (eds.) *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- ROONEY, C. M., SMITH, C. A., NG, C. Y., LOFTIN, S., LI, C., KRANCE, R. A., BRENNER, M. K. & HESLOP, H. E. 1995. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet*, 345, 9-13.
- ROONEY, C. M., SMITH, C. A., NG, C. Y., LOFTIN, S. K., SIXBEY, J. W., GAN, Y., SRIVASTAVA, D. K., BOWMAN, L. C., KRANCE, R. A., BRENNER, M. K. & HESLOP, H. E. 1998. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood*, 92, 1549-55.

- ROWE, D. T. & CLARKE, J. R. 1989. The type-specific epitopes of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 are near the carboxy terminus of the protein. *J Gen Virol*, 70 (Pt 5), 1217-29.
- ROWE, D. T., ROWE, M., EVAN, G. I., WALLACE, L. E., FARRELL, P. J. & RICKINSON, A. B. 1986. Restricted expression of EBV latent genes and T-lymphocyte-detected membrane antigen in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J*, 5, 2599-607.
- ROWE, M., GLAUNSINGER, B., VAN LEEUWEN, D., ZUO, J., SWEETMAN, D., GANEM, D., MIDDELDORP, J., WIERTZ, E. J. & RESSING, M. E. 2007. Host shutoff during productive Epstein-Barr virus infection is mediated by BGLF5 and may contribute to immune evasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3366-71.
- ROWE, M. & ZUO, J. 2010. Immune responses to Epstein-Barr virus: molecular interactions in the virus evasion of CD8+ T cell immunity. *Microbes Infect*, 12, 173-81.
- SAMANTA, M., IWAKIRI, D. & TAKADA, K. 2008. Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene*, 27, 4150-60.
- SAMPLE, J., YOUNG, L., MARTIN, B., CHATMAN, T., KIEFF, E. & RICKINSON, A. 1990. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol*, 64, 4084-92.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SCHAADT, E., BAIER, B., MAUTNER, J., BORNKAMM, G. W. & ADLER, B. 2005. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mimics B-cell receptor-dependent virus reactivation. *J Gen Virol*, 86, 551-9.
- SCHEPERS, A., PICH, D. & HAMMERSCHMIDT, W. 1996. Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus, by BZLF1. *Virology*, 220, 367-76.
- SEBELIN-WULF, K., NGUYEN, T. D., OERTEL, S., PAPP-VARY, M., TRAPPE, R. U., SCHULZKI, A., PEZZUTTO, A., RIESS, H. & SUBKLEWE, M. 2007. Quantitative analysis of EBV-specific CD4/CD8 T cell numbers, absolute CD4/CD8 T cell numbers and EBV load in solid organ transplant recipients with PLTD. *Transpl Immunol*, 17, 203-10.
- SHANNON-LOWE, C. D., NEUHIERL, B., BALDWIN, G., RICKINSON, A. B. & DELECLUSE, H. J. 2006. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7065-70.
- SHASTRI, N., CARDINAUD, S., SCHWAB, S. R., SERWOLD, T. & KUNISAWA, J. 2005. All the peptides that fit: the beginning, the middle, and the end of the MHC class I antigen-processing pathway. *Immunol Rev*, 207, 31-41.
- SHEAFFER, A. K., WEINHEIMER, S. P. & TENNEY, D. J. 1997. The human cytomegalovirus UL98 gene encodes the conserved herpesvirus alkaline nuclease. *J Gen Virol*, 78 (Pt 11), 2953-61.

- SINCLAIR, A. J., PALMERO, I., PETERS, G. & FARRELL, P. J. 1994. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J*, 13, 3321-8.
- SIXBEY, J. W., NEDRUD, J. G., RAAB-TRAUB, N., HANES, R. A. & PAGANO, J. S. 1984. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med*, 310, 1225-30.
- SKARE, J. & STROMINGER, J. L. 1980. Cloning and mapping of BamHI endonuclease fragments of DNA from the transforming B95-8 strain of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 3860-4.
- SMITH, C. A., NG, C. Y., HESLOP, H. E., HOLLADAY, M. S., RICHARDSON, S., TURNER, E. V., LOFTIN, S. K., LI, C., BRENNER, M. K. & ROONEY, C. M. 1995. Production of genetically modified Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells for adoptive transfer to patients at high risk of EBV-associated lymphoproliferative disease. *J Hematother*, 4, 73-9.
- SPECK, S. H., CHATILA, T. & FLEMINGTON, E. 1997. Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol*, 5, 399-405.
- STEVEN, N. M., ANNELS, N. E., KUMAR, A., LEESE, A. M., KURILLA, M. G. & RICKINSON, A. B. 1997. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med*, 185, 1605-17.
- SU, Z., PELUSO, M. V., RAFFEGGERST, S. H., SCHENDEL, D. J. & ROSKROW, M. A. 2001. The generation of LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with Epstein-Barr virus-positive Hodgkin disease. *Eur J Immunol*, 31, 947-58.
- TAKADA, K. & ONO, Y. 1989. Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J Virol*, 63, 445-9.
- TELLAM, J., SMITH, C., RIST, M., WEBB, N., COOPER, L., VUOCOLO, T., CONNOLLY, G., TSCHARKE, D. C., DEVOY, M. P. & KHANNA, R. 2008. Regulation of protein translation through mRNA structure influences MHC class I loading and T cell recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9319-24.
- TOMAZIN, R., HILL, A. B., JUGOVIC, P., YORK, I., VAN ENDERT, P., PLOEGH, H. L., ANDREWS, D. W. & JOHNSON, D. C. 1996. Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *EMBO J*, 15, 3256-66.
- TOMKINSON, B. & KIEFF, E. 1992. Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J Virol*, 66, 2893-903.
- TOMKINSON, B., ROBERTSON, E. & KIEFF, E. 1993. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol*, 67, 2014-25.
- TSURUMI, T., FUJITA, M. & KUDOH, A. 2005. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol*, 15, 3-15.

- TSURUMI, T., KOBAYASHI, A., TAMAI, K., DAIKOKU, T., KURACHI, R. & NISHIYAMA, Y. 1993. Functional expression and characterization of the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit. *J Virol*, 67, 4651-8.
- TUGIZOV, S. M., BERLINE, J. W. & PALEFSKY, J. M. 2003. Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Med*, 9, 307-14.
- UCHIDA, J., YASUI, T., TAKAOKA-SHICHIJO, Y., MURAOKA, M., KULWICHIT, W., RAAB-TRAUB, N. & KIKUTANI, H. 1999. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science*, 286, 300-3.
- WANG, D., LIEBOWITZ, D. & KIEFF, E. 1985. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, 43, 831-40.
- WANG, F., GREGORY, C. D., ROWE, M., RICKINSON, A. B., WANG, D., BIRKENBACH, M., KIKUTANI, H., KISHIMOTO, T. & KIEFF, E. 1987. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 3452-6.
- WANG, X. & HUTT-FLETCHER, L. M. 1998. Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp42 can bind to B cells but is not able to infect. *J Virol*, 72, 158-63.
- WATRY, D., HEDRICK, J. A., SIERVO, S., RHODES, G., LAMBERTI, J. J., LAMBRIS, J. D. & TSOUKAS, C. D. 1991. Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *J Exp Med*, 173, 971-80.
- WEBER, W., FUX, C., DAOUD-EL BABA, M., KELLER, B., WEBER, C. C., KRAMER, B. P., HEINZEN, C., AUBEL, D., BAILEY, J. E. & FUSSENEGGER, M. 2002. Macrolide-based transgene control in mammalian cells and mice. *Nat Biotechnol*, 20, 901-7.
- WEISS, L. M., MOVAHED, L. A., WARNKE, R. A. & SKLAR, J. 1989. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med*, 320, 502-6.
- WILLIAMS, H., MCAULAY, K., MACSWEEN, K. F., GALLACHER, N. J., HIGGINS, C. D., HARRISON, N., SWERDLOW, A. J. & CRAWFORD, D. H. 2005. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br J Haematol*, 129, 266-74.
- YATES, J., WARREN, N., REISMAN, D. & SUGDEN, B. 1984. A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 3806-10.
- YATES, J. L., WARREN, N. & SUGDEN, B. 1985. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, 313, 812-5.
- YEWDELL, J. W., ANTON, L. C. & BENNINK, J. R. 1996. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol*, 157, 1823-6.
- YIN, Y., MANOURY, B. & FAHRAEUS, R. 2003. Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr virus-encoded EBNA1. *Science*, 301, 1371-4.

- YOKOYAMA, N., FUJII, K., HIRATA, M., TAMAI, K., KIYONO, T., KUZUSHIMA, K., NISHIYAMA, Y., FUJITA, M. & TSURUMI, T. 1999. Assembly of the Epstein-Barr virus BBLF4, BSLF1 and BBLF2/3 proteins and their interactive properties. *J Gen Virol*, 80 (Pt 11), 2879-87.
- YOSHIDA, M., KIJIMA, M., AKITA, M. & BEPPU, T. 1990. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem*, 265, 17174-9.
- YOUNG, L. S. & MURRAY, P. G. 2003. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*, 22, 5108-21.
- YOUNG, L. S. & RICKINSON, A. B. 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 4, 757-68.
- YOUNG, L. S., YAO, Q. Y., ROONEY, C. M., SCULLEY, T. B., MOSS, D. J., RUPANI, H., LAUX, G., BORNKAMM, G. W. & RICKINSON, A. B. 1987. New type B isolates of Epstein-Barr virus from Burkitt's lymphoma and from normal individuals in endemic areas. *J Gen Virol*, 68 (Pt 11), 2853-62.
- YU, X., WANG, Z. & MERTZ, J. E. 2007. ZEB1 regulates the latent-lytic switch in infection by Epstein-Barr virus. *PLoS Pathog*, 3, e194.
- YUAN, J., CAHIR-MCFARLAND, E., ZHAO, B. & KIEFF, E. 2006. Virus and cell RNAs expressed during Epstein-Barr virus replication. *J Virol*, 80, 2548-65.
- ZEIDLER, R., EISSNER, G., MEISSNER, P., UEBEL, S., TAMPE, R., LAZIS, S. & HAMMERSCHMIDT, W. 1997. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood*, 90, 2390-7.
- ZIMMER, U., ADLINDER, H. K., LENOIR, G. M., VUILLAUME, M., KNEBEL-DOEBERITZ, M. V., LAUX, G., DESGRANGES, C., WITTMANN, P., FREESE, U. K., SCHNEIDER, U. & ET AL. 1986. Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology*, 154, 56-66.
- ZUO, J., CURRIN, A., GRIFFIN, B. D., SHANNON-LOWE, C., THOMAS, W. A., RESSING, M. E., WIERTZ, E. J. & ROWE, M. 2009. The Epstein-Barr virus G-protein-coupled receptor contributes to immune evasion by targeting MHC class I molecules for degradation. *PLoS Pathog*, 5, e1000255.
- ZUO, J., THOMAS, W., VAN LEEUWEN, D., MIDDELDORP, J. M., WIERTZ, E. J., RESSING, M. E. & ROWE, M. 2008. The DNase of gammaherpesviruses impairs recognition by virus-specific CD8+ T cells through an additional host shutoff function. *J Virol*, 82, 2385-93.
- ZUR HAUSEN, H., O'NEILL, F. J., FREESE, U. K. & HECKER, E. 1978. Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promoter TPA. *Nature*, 272, 373-5.
- ZUR HAUSEN, H., SCHULTE-HOLTHAUSEN, H., KLEIN, G., HENLE, W., HENLE, G., CLIFFORD, P. & SANTESSON, L. 1970. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*, 228, 1056-8.

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all jenen bedanken, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Mein großer und sehr herzlicher Dank geht an PD. Dr. Josef Mautner und Prof. Dr. Uta Behrends für die freundliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die ausgezeichnete Betreuung. Bei Josef möchte ich mich besonders für seine vielen Anregungen, die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit und dafür, dass er bei Fragen und Problemen jederzeit zur Verfügung stand, bedanken.
- Bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß, die sich als Zweitgutachterin für meine Arbeit zur Verfügung gestellt hat, bedanke ich mich herzlich.
- Bedanken möchte ich mich auch bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die tolle Arbeitsatmosphäre, ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Allen wünsche ich viel Erfolg und Glück für ihre zukünftigen, wissenschaftlichen Arbeiten.
- Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, den Zuspruch und all die lieben Wünsche.
- Nicht zuletzt danke ich Michi für seine Geduld und dafür, dass er immer für mich da war.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Isabella Sofia Rampp

*26.12.1982 in München

isabella.rampp@helmholtz-muenchen.de

Schule

1993-2000	Willy-Brandt-Gesamtschule, München
2000-2002	Willi-Graf-Gymnasium, München
2002	Abitur

Studium

2002-2007	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München Abschluss: Diplom-Biologin Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Zellbiologie und Biochemie Zusatzfach: Immunologie
03/2007-12/2007	Diplomarbeit im Fachgebiet Mikrobiologie Thema: Einfluss unbekannter Faktoren auf die K ⁺ Abhängigkeit der <i>kdpFABC</i> -Expression in <i>Escherichia coli</i>

Promotion

04/2008-heute	Promotion, durchgeführt am Helmholtz Zentrum München am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, in der klinischen Kooperationsgruppe „Pädiatrische Tumormimmunologie“ Thema: Analyse der CD4 ⁺ T-Zellerkennung lytisch Epstein-Barr-Virus-infizierter B-Zellen
---------------	---